

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉA HARUKO ARAKAKI

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
RICA EM COBRE E ZINCO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) E TESTADOS EM
RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA**

CURITIBA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉA HARUKO ARAKAKI

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
RICA EM COBRE E ZINCO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) E TESTADOS EM
RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor do Programa de Pós-
Graduação em Processos Biotecnológicos.
Área de Concentração: Agroindústria e
biocombustíveis. Setor de Tecnologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^ª Dr^a Luciana Porto de Souza
Vandenberghe

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2010

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e iluminação em minha vida.

Aos familiares e amigos que sempre estiveram presentes em meus pensamentos e longas horas de ligação.

A Professora Dr^a. Luciana P. S. Vandenberghe pela orientação, amizade e incentivo.

Ao Professor Dr. Carlos R. Soccol pela co-orientação, conselhos e direcionamento nas pesquisas.

Ao químico Alexsandro Gregório pela realização das análises de micronutrientes no Espectrofotômetro de Absorção de Massa - LPH.

Ao Professor Dr. Paulo Fontoura pelas análises da polpa do fruto no Laboratório de Análises de Alimentos.

A Prof. Dr^a. Vanete Thomas Soccol, por ter concedido a realização dos testes de identificação molecular no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

A Mitiyo Miyaoka pela amizade, sinceridade e conselhos.

Aos Professores Adenise, Júlio e Adriane pelas conversas e conselhos.

Aos Professores Marco Aurélio e Rosângela por contribuírem na correção da tese e participarem como membros da banca de defesa.

Ao estagiário Ryu Masaki pela amizade e dedicação durante as pesquisas.

Aos colegas que conheci durante o tempo que estiveram no laboratório para a realização das minhas pesquisas: Flávera, Marlene, Cristine, Rafael, Gerson, Francisco, Sandra, L. Gustavo, Eduardo, Valesca, Jaqueline, Augustus, Bruno, Ricardo, Luiz e Celina (secretaria).

Aos amigos que me apoiaram dentro e fora do Laboratório (confraternizações): Sascha, Carol Tiemi, Carol Maria, Michele, Lucianna, Carol Caron, Letti, Gabrielle, Vanessa, Gisele, Joana, Marisa, Sandra e Susan Karp.

Ao Gessiel que nunca me deixou de apoiar em todos os sentidos.

À REUNI/CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

O objetivo principal do presente trabalho foi a produção de biomassa rica em zinco ou cobre para suplementação em ração animal por fermentação submersa utilizando subprodutos agrícolas produzidos no Estado do Paraná. Os frutos maduros de baru (*Dipteryx alata*) foram coletados de várias localidades de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Em seguida, foi determinada a composição centesimal da polpa. Da polpa, foram isoladas 11 cepas de leveduras, as quais foram identificadas com o auxílio do sistema comercial API20C AUX[®] e também por técnicas de biologia molecular (seqüenciamento) da melhor linhagem acumuladora de zinco e cobre. Para todos os experimentos foi realizado o preparo de inóculo em frasco de *Erlenmeyer* de 250 mL (volume de 100 mL), incubado sob agitação a 120 rpm, 30 °C durante 24 horas, ou até obter-se uma concentração de células da ordem de 1×10^7 a 1×10^8 células/mL. Foram testadas neste experimento, 11 leveduras isoladas do fruto baru e a cepa *Pichia guilliermondii* NRRLY27063 como referência. As condições utilizadas foram: melaço de soja e de cana a 5 °Brix; extrato de levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. A quantidade de inóculo utilizada foi de 10 % referente ao volume total (100 mL). As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; 120 horas. Dentre as 11 cepas isoladas, uma delas (BARU05, identificada pelo kit Api como *Candida lusitaniae* ou 100 % de identificação molecular, para *Candida pelliculosa*) apresentou melhores resultados. A otimização dos fatores físicos (pH, temperatura e taxa de inóculo) foi realizada como suporte de planejamentos experimentais do tipo fatorial 2^3 , usando como substrato melaço de cana a 5° Brix enriquecido com 0,1 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer 250 mL, em shaker a 120 rpm por 72 horas. A interpretação dos resultados obtidos foi realizada com o auxílio do STATISTICA7. Para o estudo da influência dos fatores químicos sobre o processo de produção de biomassa (g/L) e rendimento (%) do bioacúmulo dos microelementos, um planejamento experimental do tipo fatorial incompleto de 2^{7-4} com 3 pontos centrais foi empregado para a seleção das variáveis. Na segunda etapa de otimização utilizou-se um planejamento experimental fatorial incompleto 2^{4-1} para mais uma seleção de variáveis significativas. Uma terceira etapa de otimização foi realizada com o suporte de um planejamento do tipo DCCR. Os parâmetros físicos otimizados para o processo de bioacúmulo de cobre foram: pH 6, taxa de inóculo de 7,5 %, 30 °C. Para o zinco: pH 4, taxa de inóculo de 5 %, 28 °C. Após as etapas de otimização obteve-se para o zinco, um rendimento de 90,10 % e 12,046 g/L de biomassa. Para o cobre, o rendimento foi de 95,04 % e obtendo-se 13,397 g/L de biomassa. O processo de produção foi então conduzido em biorreator de 10 litros BioFlo[®] 110 (duplicata). O meio empregado na fermentação foi o melaço de cana a 10 °Brix (sólidos solúveis). A agitação variou de acordo com o oxigênio dissolvido (DO_2) que era de 30 %. O melaço de cana foi suplementado para o aumento do bioacúmulo e biomassa com 3 g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e 0,1 g/L de $\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3$ para o zinco, e com 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ para o cobre. Foi obtido para a fermentação de zinco 90,53% de rendimento e 36,33 g/L de biomassa em 24 horas de fermentação. Para o cobre, foi obtido 91,98% de rendimento e 38,85 g/L de biomassa após 60 horas de fermentação. Para a fermentação em batelada alimentada de zinco obteve-se 58,43 g/L de biomassa a qual acumulou 22,73 mg/L (100 %) de zinco. O teste de cobre para a batelada-alimentada 57,54 g/L de biomassa e 100% de rendimento para o bioacúmulo. Foi feita a análise de proteínas para biomassa seca obtida tanto para o processo do zinco

quanto para o do cobre obtendo-se 49 % de proteínas. O processo demonstrou-se viável e promissor. Os produtos obtidos serão testados em ração animal.

Palavras-chave: Baru. Leveduras. Micronutrientes. Bioacumulação

ABSTRACT

The main objective of this present work was the production of biomass rich in zinc or copper for supplementation in animal feed by submerge fermentation using agricultural by-products produced in State of Paraná. Mature fruits of Baru (*Dipteryx alata*) were collected from various locations of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In sequence, the centesimal composition of pulp was determined. From pulp, 11 yeast strains were isolated. All strains were identified with assistance of commercial system API20C AUX[®], and also a molecular biology analysis (sequencing) of the best zinc and copper accumulator strain was realized. For all experiments, prepare of inoculum was realized in *Erlenmeyer* flasks of 250 ml (100 mL of media), incubated at agitation in *Shaker*-type incubator at 30 °C and 120 rpm during 24 hours, or until obtain a cell concentration of 1×10^7 to 1×10^8 cells/mL. In this experiment, 11 yeast strains isolated from Baru fruit and *Pichia guilliermondii* NRRLY27063 strain (as reference) were tested. The conditions were: sugarcane and soy molasses at 5 °Brix; yeast extract, 10 g/L; (NH₄)₂SO₄, 5 g/L; KH₂PO₄, 5 g/L; MgSO₄, 0.5 g/L. Inoculum rate was 10 % of total volume (100 ml). Physical conditions for all experiments were: temperature, 30 °C; initial pH, 6.0; agitation, 120 rpm; cultivation time, 120 hours. Between 11 strains isolated, one of them (BARU 05, identified as *Candida lusitaniae* by commercial system API20C AUX[®] and as *Candida pelliculosa* with 100 % of confirmation, according with molecular identification) demonstrated better results. Optimization of physical factors (pH, temperature and inoculum rate) was realized with support of 2³ factorial experimental designs, using as substrate sugarcane molasses at 5 °Brix enriched with 0.1 g/L CuSO₄.5H₂O or ZnSO₄.7H₂O. Experiments were realized in *Erlenmeyer* flasks of 250 mL with cotton cover, in *Shaker* at 120 rpm for 72 hours. Interpretation of results obtained was realized with assistance of STATISTICA7 program. For study of influence of chemical factors on both biomass production process (g/L) and microelement bioaccumulation uptake (%), a 2⁷⁻⁴ incomplete factorial experimental design with 3 center points was employed for selection of variables. 7 components in 2 different levels of concentration (g/L) and center points. On second step of optimization, an experimental design 2⁴⁻¹ was used, for another selection of significant variables. A third step of optimization was realized with support of a DCCR design. The physical conditions optimized for copper bioaccumulation process were: pH 6, 7.5 % of inoculum rate, 30 °C. For zinc: pH 4, inoculum rate: 5 %, 28 °C. After the steps of optimization, were obtained 90.10% of zinc uptake and 12.046 g/L of biomass for zinc process. For copper process, were obtained 95.04% of uptake and 13.397 g/L of biomass. The process of production was then conducted on 10 liters BioFlo[®] 110 bioreactor (duplicate). The media employed in fermentation was sugarcane molasses at 10 °Brix. Agitation varied according with dissolved oxygen (DO₂) that was 30%. Sugarcane molasses was supplemented for increase in bioaccumulation and biomass production with 3 g/L of (NH₂)₂CO and 0.1 g/L of Fe₂(SO₄)₃ for zinc, and with 2 g/L of (NH₄)₂SO₄ and 3 g/L of (NH₄)₂HPO₄ for copper. For zinc fermentation were obtained 90.53% of zinc uptake and 36.33 g/L of biomass production after 24 hours of fermentation. For copper, were obtained 91.98% of copper uptake and 38.85 g/L of biomass after 60 hours of process. For zinc fed-batch fermentation was obtained 58.43 g/L of biomass and bioaccumulation of 22.73 mg/L (100 %) of zinc. For copper, were obtained 57.54 g/L of biomass and 100 % uptake for bioaccumulation. Analysis of proteins content of dry biomass was realized for both zinc and copper process, obtaining 49 % of proteins. The process demonstrated to be viable and promising. The obtained product will be tested on animal feed.

Keywords: Baru. Yeasts. Micronutrients. Bioaccumulation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O CERRADO E SUA BIODIVERSIDADE	19
2.2 BARU (<i>Dipteryx alata</i>)	21
2.3 MICRONUTRIENTES	23
2.3.1 Zinco	23
2.3.1.1 Funções do zinco	24
2.3.1.2 Interações do zinco com outros elementos	24
2.3.2 Cobre	25
2.3.2.1 Funções do cobre	26
2.3.2.2 Interações do cobre com outros elementos	26
2.4 BIOSSORÇÃO E ACUMULAÇÃO INTRACELULAR	27
2.4.1 Processos utilizados pelos microrganismos para remoção de metais pesados	27
2.4.2 Microrganismos capazes de absorver metais	29
2.5 ORGANISMOS CAPAZES DE ACUMULAR ZINCO E COBRE	32
2.6 LEVEDURAS ACUMULADORAS DE METAIS	33
2.6.1 Leveduras	33
2.6.2 Aspectos metabólicos	36
2.6.3 Bioacúmulo de metais por leveduras	37
2.6.4 Fatores que influenciam o bioacúmulo de metais por células de leveduras	40
2.6.5 Exemplos de bioacúmulo de micronutrientes por leveduras	43
2.6.6 Caracterização e identificação de leveduras	44
2.7 PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES	45
2.7.1 Melão de cana	47
2.7.2 Melão de soja	48
2.8 UTILIZAÇÃO DE MINERAIS EM RAÇÃO ANIMAL	49
2.9 DETERMINAÇÕES DE ZINCO E COBRE	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 MATÉRIA-PRIMA: FONTE DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS	55
3.1.1 Coleta de amostras para o isolamento de cepas de leveduras	55
3.1.2 Caracterização físico-química da polpa de baru	57
pH	57
Atividade água	57
Análise termoanalítica	58
Proteínas	58
Lipídios	58
Resíduo mineral fixo (Cinzas)	58
Umidade	58
Fibra bruta	58
Carboidratos	59
3.2 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DO BARU	59
3.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS	61
3.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS	61

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA CEPA SELECIONADA	62
3.5.1 Extração de DNA.....	62
3.5.2 Sequenciamento.....	63
3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS	63
3.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	63
3.8 SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA..	64
3.9 CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE.....	65
3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES DO PROCESSO	65
3.10.1 Otimização das variáveis físicas do processo de bioacúmulo de zinco e cobre	66
3.10.2 Otimização das variáveis químicas do processo de bioacúmulo de zinco e cobre.	67
3.10.3 Validação da otimização dos fatores físico-químicos do processo	70
3.11 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA BIOMASSA RICA EM ZINCO E COBRE	71
3.12 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE EM BIORREATOR DE 10 LITROS.	71
3.12.1 Fermentação em batelada	72
3.12.2 Fermentação em batelada alimentada.....	73
3.13 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA PRODUZIDA.....	74
3.14 DETERMINAÇÃO DE ZINCO E COBRE.....	74
3.15 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES	75
3.16 CÁLCULO DO RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE	75
3.17 CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO E DE BIOACÚMULO	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FRUTO BARU	77
4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA MICROFLORA DO BARU	80
4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS LEVEDURAS.....	80
4.3.1 Identificação bioquímica das cepas de leveduras isoladas da polpa de baru.	80
4.3.2 Identificação molecular da cepa BARU05.	81
4.4 SELEÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	82
4.4.1 Seleção de cepas para produção de biomassa rica em zinco	83
4.4.2 Seleção de cepas para a produção de biomassa rica em cobre.	84
4.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO E COBRE	85
4.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO E EM COBRE.....	89
4.6.1 Otimização da produção de biomassa rica em zinco.....	89
4.6.1.1 Otimização das condições físicas da produção de biomassa rica em zinco	89
4.6.1.2 Otimização das condições químicas da produção de biomassa rica em zinco	91
<i>Seleção da fonte de nitrogênio</i>	<i>92</i>
<i>Escolha da concentração do zinco</i>	<i>94</i>
<i>Primeira etapa da otimização da composição química – Planejamento do tipo fatorial incompleto de 2^{7-4} com 3 pontos centrais</i>	<i>96</i>
<i>Segunda etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo 2^{4-1}</i>	<i>98</i>
<i>Terceira etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental do tipo rotacional composto central - DCCR.....</i>	<i>101</i>
<i>Validação da otimização das condições físico-químicas do processo</i>	<i>106</i>
4.6.2 Otimização da produção de biomassa rica em cobre.....	107
4.6.2.1 Otimização das condições físicas da produção de biomassa rica em cobre	107

4.6.2.2 Otimização das condições químicas da produção de biomassa rica em cobre	110
<i>Seleção da fonte de nitrogênio</i>	110
<i>Escolha da concentração do cobre</i>	111
<i>Primeira etapa da otimização das concentrações químicas – Planejamento do tipo fatorial incompleto de 2^{7-4} com 3 pontos centrais</i>	113
<i>Segunda etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo 2^{4-1}</i>	115
<i>Terceira etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental do tipo rotacional composto central - DCCR.....</i>	118
<i>Validação da otimização das condições físico-químicas do processo</i>	123
4.7 CINÉTICA DA PRODUÇÃO RICA EM MICRONUTRIENTES NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	125
4.7.1 Cinética da produção de biomassa rica em zinco	125
4.8 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES EM BIORREATOR DO TIPO STR – BATELADA	128
4.8.1 Produção de biomassa rica em zinco	128
4.8.2 Produção de biomassa rica em cobre.....	130
4.9 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES EM BIORREATOR DO TIPO STR – BATELADA ALIMENTADA	132
4.9.1 Produção de biomassa rica em zinco	132
4.9.2 Produção de biomassa rica em cobre.....	133
5 CONCLUSÕES.....	137
6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	140
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - AMENDOAS DO BARU	22
FIGURA 2 - MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE METAIS E CÉLULAS MICROBIANAS	29
FIGURA 3 - HOMEOSTASE DO ZINCO EM LEVEDURAS	39
FIGURA 4 - ESPECTROFOTÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	53
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DESENVOLVIDO DO PROCESSO.....	54
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DE CAMPO GRANDE-MS ONDE OS FRUTOS DE BARU FORAM COLHIDOS.....	56
FIGURA 7 - O FRUTO BARU (<i>Dipteryx alata</i> Vogel)	57
FIGURA 8 - POLPA DO BARU	60
FIGURA 9 - COLÔNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU	60
FIGURA 10 - O SISTEMA API20C AUX DA MARCA BIOMÉRIEUX.....	61
FIGURA 11 - SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM <i>SHAKER</i>	64
FIGURA 12 - BIORREATOR DE 10 LITROS	72
FIGURA 13 - BIORREATOR DE 10 LITROS E O FRASCO DE ALIMENTAÇÃO ...	73
FIGURA 14 - ANÁLISE TGA/DTA DA POLPA MADURA DO BARU	78
FIGURA 15 - LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU	80
FIGURA 16 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DO DNA DA LEVEDURA BARU05 – <i>Candida pelliculosa</i>	82
FIGURA 17 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA DE <i>Candida pelliculosa</i> DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO	86
FIGURA 18 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO PELA CEPA <i>Candida pelliculosa</i> BARU05.....	86
FIGURA 19 - CONSUMO DE SUBSTRATO (AÇÚCARES REDUTORES) DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO	88
FIGURA 20 - CONSUMO DE SUBSTRATO (AÇÚCARES TOTAIS) DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO	88
FIGURA 21 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – ZINCO – BIOACÚMULO	90
FIGURA 22 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – ZINCO – BIOMASSA.....	90
FIGURA 23 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – ZINCO	93
FIGURA 24 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – ZINCO.....	93
FIGURA 25 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO.....	95
FIGURA 26 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE ZINCO EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO ADICIONADO.....	95
FIGURA 27 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	

– FATORES QUÍMICOS – ZINCO – BIOACÚMULO	97
FIGURA 28 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	
– FATORES QUÍMICOS – ZINCO – BIOMASSA.....	98
FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	
– FATORES QUÍMICOS – BIOACÚMULO	100
FIGURA 30 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	
– FATORES QUÍMICOS – BIOMASSA	101
FIGURA 31 - GRÁFICO DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR.....	103
FIGURA 32 - GRÁFICO DE PARETO PARA BIOACÚMULO DE ZINCO DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR.....	103
FIGURA 33 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR.....	104
FIGURA 34 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA BIOACÚMULO DE ZINCO DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR.....	105
FIGURA 35 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – COBRE – BIOACÚMULO	108
FIGURA 36 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – COBRE – BIOMASSA	109
FIGURA 37 - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA – COBRE.....	111
FIGURA 38 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – COBRE	111
FIGURA 39 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	112
FIGURA 40 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE COBRE EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE.....	112
FIGURA 41 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	
– FATORES QUÍMICOS – COBRE – BIOACÚMULO	114
FIGURA 42 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	
– FATORES QUÍMICOS – COBRE – BIOMASSA.....	115
FIGURA 43 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	
– FATORES QUÍMICOS – BIOMASSA	117
FIGURA 44 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	
– FATORES QUÍMICOS – BIOACÚMULO	118
FIGURA 45 - GRÁFICO DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR.....	120
FIGURA 46 - GRÁFICO DE PARETO PARA BIOACÚMULO DE COBRE DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR.....	120
FIGURA 47 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA	

	DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR.....	121
FIGURA 48 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA BIOACÚMULO DE COBRE DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR.....	122
FIGURA 49 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	125
FIGURA 50 -	BIOACÚMULO DE ZINCO EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	126
FIGURA 51 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	127
FIGURA 52 -	BIOACÚMULO DE COBRE EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	127
FIGURA 53 -	ZINCO ACUMULADO (Zn Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – ZINCO	129
FIGURA 54 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – ZINCO.....	129
FIGURA 55 -	COBRE ACUMULADO (Cu Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – COBRE	131
FIGURA 56 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA.....	131
FIGURA 57 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA.....	132
FIGURA 58 -	ZINCO ACUMULADO (Zn Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA.....	133
FIGURA 59 -	COBRE ACUMULADO (Cu Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA.....	134
FIGURA 60 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA.....	134

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ACÚMULO DE ZINCO E COBRE PELA BIOMASSA DE VÁRIOS ORGANISMOS.....	33
TABELA 2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ – VARIÁVEIS E NÍVEIS.....	66
TABELA 3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ – FATORES FÍSICO-QUÍMICOS	66
TABELA 4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁷⁻⁴ COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES E NÍVEIS.....	67
TABELA 5 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁷⁻⁴ COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS.....	67
TABELA 6 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁴⁻¹ – FATORES E NÍVEIS – COBRE	68
TABELA 7 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁴⁻¹ – FATORES QUÍMICOS – COBRE	68
TABELA 8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁴⁻¹ – FATORES E NÍVEIS – ZINCO.....	68
TABELA 9 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2 ⁴⁻¹ – FATORES QUÍMICOS – ZINCO	69
TABELA 10 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA COBRE – VARIÁVEIS E NÍVEIS.....	69
TABELA 11 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA COBRE - EXPERIMENTOS	69
TABELA 12 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA ZINCO – VARIÁVEIS E NÍVEIS	70
TABELA 13 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA ZINCO - EXPERIMENTOS	70
TABELA 14 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA POLPA VERDE E MADURA DO BARU	77
TABELA 15 - pH E ATIVIDADE DE ÁGUA DA POLPA VERDE E MADURA DO BARU	77
TABELA 16 - IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU	81
TABELA 17 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE SOJA – ZINCO – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO <i>Pichia guilliermondii</i>	83
TABELA 18 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE CANA – ZINCO – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO <i>Pichia guilliermondii</i>	84
TABELA 19 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE CANA – COBRE – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO <i>Pichia guilliermondii</i>	85
TABELA 20 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO E BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES FÍSICOS – ZINCO.....	91
TABELA 21 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS	

– PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	96
TABELA 22 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	99
TABELA 23 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR.....	102
TABELA 24 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS.....	106
TABELA 25 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA BIOACÚMULO DE ZINCO NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS	107
TABELA 26 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO E BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES FÍSICOS – COBRE	110
TABELA 27 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS	113
TABELA 28 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}	116
TABELA 29 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR.....	119
TABELA 30 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS.....	124
TABELA 31 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA BIOACÚMULO DE COBRE NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS	124
TABELA 32 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM CADA ETAPA DO PROCESSO FERMENTATIVO	135

1 INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos científicos apresentam conhecimentos sobre a diversidade microbiana (COLWELL, 1997; HUNTER, 1998). Os benefícios econômicos são relacionados à descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos para a produção de novos antibióticos e de agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas.

Como exemplo, pesquisas realizadas por Oliveira (2006) e Roepecke (2007), com leveduras capazes de acumular selênio e zinco orgânico abriram caminhos para a produção de novos produtos. Elementos como o cobre, zinco e selênio são vitais para o bom desempenho e manutenção do metabolismo animal.

O zinco atua como componente ativo ou co-fator em importantes sistemas enzimáticos e tem papel fundamental no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, e na síntese e metabolismo de ácidos nucleicos (RNA) e proteínas (EIDE, 1997; GITAN *et al.*, 1998; HISANO *et al.*, 2007).

O cobre pode estar presente na respiração celular, formação óssea, desenvolvimento do tecido conjuntivo, mielinização do sistema nervoso central, queratinização e pigmentação de tecidos, além de ser componente essencial de diversas metaloenzimas (MCDOWELL, 1992; VASQUEZ *et al.*, 2001; ORTOLANI, 2002; MARQUES *et al.*, 2003).

Os microelementos, também chamados elementos traços ou oligoelementos, estão presentes em quantidades pequenas no organismo e são expressos em mg/kg ou ppm (partes por milhão) de peso vivo (ORTOLANI, 2002). Os resultados dos estudos apresentados por Moraes *et al.* (1999) e Sucupira *et al.* (2007) confirmam que as deficiências mais comuns de microelementos em bovinos e ovinos no Brasil são as de cobre e cobalto.

Para a atividade pecuarista o interesse em relação aos elementos traço, surge, principalmente para substituir, ou pelo menos diminuir, o atual uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos aplicados nos animais, que podem ser prejudiciais ao consumidor e ao meio ambiente (HISANO *et al.*, 2007). Estudos sugerem que altas dosagens de zinco na dieta de suínos possuem eficácia no controle de algumas bactérias patogênicas, além de melhorar o desempenho do animal (HAHN; BAKER, 1993),

prevenir ou curar a paraqueratose (TUCKER; SALMON, 1955) e no tratamento da qualidade dos ovos (SUCUPIRA *et al.*, 2007). O papel e importância do cobre no metabolismo animal são bem conhecidos (VASQUEZ *et al.*, 2001). Por sua vez, o cobre é um nutriente essencial para os humanos, e a manutenção dos seus níveis é importante, uma vez que seu metabolismo está envolvido com estresse oxidativo e patologias, como a Doença de Wilson (MORO *et al.*, 2007). A deficiência e toxicidade do cobre em ruminantes ocorrem freqüentemente em muitas partes do mundo. A mais importante deficiência de origem mineral depois do fósforo, talvez seja a de cobre (MILTIMORE; MASON, 1971). O desenvolvimento da deficiência de cobre depende tanto da concentração do mesmo metal, na dieta, como das concentrações dos antagonistas que interferem com a absorção e a subsequente utilização para os processos metabólicos (GOONERATNE *et al.*, 1989). Porém, o ganho de peso de alguns rumimantes é abordado como o elemento cobre essencial para o desenvolvimento (HAUSCHILD *et al.*, 2008).

Para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009) sabe-se que a produção de soja anual é de mais de 58.038 milhões de toneladas, o que demonstra uma produção significativa ao país. Entretanto, o Ministério ainda afirma que, para a produção do melaço de cana, sabe-se que é entorno de 27 milhões/toneladas.

É com essa justificativa que se espera o desenvolvimento de processos alternativos para a produção de biomassa com acúmulo de cobre e zinco com a utilização de mecanismos tecnológicos rápidos e viáveis industrialmente. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um bioprocessos para obtenção de biomassa de leveduras com acúmulo de altos teores de zinco e cobre orgânicos por fermentação submersa utilizando resíduos e/ou subprodutos de baixo custo.

1.1 OBJETIVO GERAL

- O presente trabalho visou desenvolver um bioprocessos para a produção de biomassa rica em zinco e/ou cobre, empregando-se fermentação submersa utilizando resíduos/subprodutos da agroindústria paranaense e cepas isoladas da microflora do da polpa do fruto baru.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a polpa verde e madura do fruto Baru através de análises físico-químicas;
- Isolar cepas de leveduras da microbiota do fruto Baru;
- Identificar as cepas de leveduras isoladas com o sistema Api 20C Aux;
- Determinar e selecionar a(s) cepa(s) de leveduras isoladas e de bancos de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia com a melhor capacidade de acumular os micronutrientes;
- Testar e estabelecer protocolo de análise para determinação dos micronutrientes acumulados pela biomassa produzida;
- Realizar a otimização das condições físico-químicas do processo de produção de biomassa rica em zinco e/ou cobre orgânicos em frascos de *Erlenmeyer* (escala laboratorial) por fermentação submersa;
- Acompanhar a evolução da cinética de produção de biomassa rica em zinco e cobre;
- Produzir biomassa rica em micronutrientes, nas condições otimizadas anteriormente, em biorreator de bancada em operação de batelada e batelada alimentada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CERRADO E SUA BIODIVERSIDADE

Segundo a Fundação Centro Brasileiro de Referência e Apoio Cultural (BEHR; NASSER, 1999), o Cerrado pode ser definido como “Um domínio de solo/vegetação/clima formado por um mosaico de diferentes tipos de vegetação, os quais refletem a diversidade de climas, de solos e de topografia existente nessa vasta região”.

É o segundo maior bioma existente no Brasil e na América do Sul, cobrindo aproximadamente 2 milhões de km² (22% do território nacional), é encontrado predominantemente no Centro Oeste, e sua vegetação pode ser encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Roraima, e ainda no Distrito Federal (EITEN, 1990).

Possui uma grande riqueza biológica, sendo 1/3 do conjunto de diferentes espécies animais e vegetais brasileiros, e 5% da fauna e flora mundiais (ALHO; MARTINS, 1995), devido a alguns fatores como a existência de trechos das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul na região (a citar, as bacias Amazônicas, do São Francisco e da Platina), o compartilhamento de espécies com outros biomas vizinhos (no caso, o Cerrado possui fronteiras com a Mata Atlântica, Caatinga, Floresta Amazônica e Pantanal Mato-grossense), além de se encontrar na zona tropica e onde vivem dois terços das espécies vivas descritas. Apesar de toda essa riqueza, o Cerrado é atualmente ameaçado pela ação do homem, principalmente através das queimadas (feitas propositalmente para limpar o terreno para cultivo, mas que muitas vezes perde-se o controle) e da agropecuária (que destrói a vegetação nativa para a criação de gado ou para cultivo, além de poluir o ambiente com agrotóxicos e fertilizantes), além da erosão e da perda de fertilidade do solo que essas ações indiretamente causam. Segundo Eiten (1990), dos 2.040.000 km² da área total do Cerrado, cerca de 470.000 km² encontram-se ocupados pela agricultura, sendo 100.000 km² com culturas anuais, 350.000 km² com pastagens cultivadas e 20.000 km² com culturas perenes e florestais. A esses somam-se cerca de 900.000 km² de área utilizada como pastagens naturais e 103.000 km² consideradas como área produtiva sem uso, isto é, em descanso, em estágio avançado de

degradação ou simplesmente abertas e não utilizadas. Estima-se que apenas 7% da região do Cerrado mantêm a vegetação natural preservada; ou seja 93% da vegetação do Cerrado já foi submetida a algum tipo de uso, intensivo ou extensivo.

A região do Cerrado apresenta uma grande biodiversidade dentro da vegetação savânica do mundo, na qual uma vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexiste com árvores esparsas, baixas, tortuosas, com cascas grossas, folhas largas e sistemas radiculares profundos. Apresentam estratégias de adaptação à seca, como raízes alcançando profundidades superiores a 10 m, germinação de sementes na época das chuvas e crescimento radicular pronunciado nos primeiros estádios de desenvolvimento (PINTO, 1993; ALMEIDA *et al.*, 1998).

A conservação da biodiversidade é constantemente comprometida pelos modelos de manejo adotados na exploração dos recursos naturais. A questão central seria o uso sustentável dos recursos naturais propiciarem formas que garantam a perenidade de espécies das formas genéticas e dos ecossistemas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A vegetação nativa do Cerrado tem como característica marcante o “aspecto tortuoso e torcido, freqüentemente inclinado e até mesmo paralelo ao chão” (EITEN, 1990). As raízes das plantas podem facilmente infiltrar-se a mais de 10 metros abaixo do solo à procura de água e nutrientes; as árvores nativas em particular possuem freqüentemente casca grossa e corticosa, e folhas largas e duras, que quebram-se facilmente ao serem dobradas. Essas características são adaptações ao clima característico da região, marcado por duas estações bem definidas: uma chuvosa (verão) e uma seca (inverno). Outras adaptações incluem germinação de sementes apenas na época de chuvas e crescimento notório da raiz nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta.

A distribuição da vegetação é bem irregular, tendo como fatores determinantes a característica do solo e a freqüência de queimadas (naturais ou antrópicas), podendo observar desde a formação de grandes campos de gramíneas, até a formação de formações florestais, além de paisagens intermediárias, semelhante à savana africana.

A ocupação dessas terras pela agricultura provoca profundas alterações ambientais, com a descaracterização e a destruição da vegetação nativa (VILELA, 1992).

Diante dessas qualificações o Cerrado, se for manejado adequadamente, pode fornecer matéria-prima para a indústria, garantindo a conservação da fauna e flora nativas, bem como a manutenção da qualidade da água (POZO, 1997).

2.2 BARU (*Dipteryx alata*)

Espécie nativa do Cerrado, o baru (*Dipteryx alata*), conhecida também pelos nomes populares cumbaru, cumaru, feijão coco, emburema brava, *tonka beans*. Encontrase disseminado pelo Cerrado, sendo encontrado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato-Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (LORENZI, 1992), apesar de nesse último o baru estar em risco de desaparecer, sendo sua conservação genética feita através de populações base “ex situ”. O autor citado acima descreveu que o baru pertence à família Leguminosae, sendo descrita como uma árvore com altura média de 15 m, podendo alcançar mais de 25 m em solos mais férteis. A copa pode ser alongada ou larga, de 6 a 11 m de diâmetro. A semente elipóide apresenta dimensão e massa variadas, associada com a massa do fruto. O comprimento varia de 1 a 3,5 cm e a largura de 0,9 a 1,3 cm. A cor brilhante do tegumento varia de marrom-amarelada a quase preta, algumas apresentam fissuras transversais mostrando a cor branca a creme dos cotilédones.

Sua madeira é de alta densidade (1,1 g/cm³), compacta, altamente durável e resistente ao apodrecimento, fungos e cupins, sendo indicada por Lorenzi (1992) para a fabricação de estacas, postes, moirões, dormentes e construção civil (vigas, caibros, batentes, tábuas e tacos para assoalhos), bem como para a fabricação de carrocerias e implementos agrícolas. A casca do tronco é utilizada para fins medicinais, na cura de dores na coluna.

O baru é considerado indicador de solos com melhor condição de fertilidade (CORRÊA, 1999). A espécie ocorre em diversas formações florestais, cerradão, e em menor intensidade, nas formações abertas de cerrado (LORENZI, 1992; MACEDO, 1996). Como recurso apresenta usos múltiplos, com emprego na alimentação humana e animal (ARAKAKI, 2004), como medicinal, aromática além de espécie madeireira com potencial silvicultural.

Ainda mais útil que a madeira são seus frutos; sendo uma das poucas espécies que frutificam frutos carnosos na estação seca do Cerrado, o baru atua como importante espécie sustentadora da fauna nessa época. Cada planta produz cerca de 2.000 à 6.000 frutos, sendo a colheita realizada entre setembro e outubro. Tanto a polpa quanto a amêndoa são comestíveis, sendo utilizadas também na alimentação da população local. A amêndoa torrada (Figura 1) possui características sensoriais muito

agradáveis comparadas às do amendoim torrado, sendo utilizada como aperitivo, em inúmeras receitas sugeridas por Almeida (1998), ou para enriquecimento de pães, bolos, sorvetes, doces e paçoquinhas. O fruto também é altamente nutritivo: tanto a polpa quanto a amêndoa são fontes de carboidrato, proteína e óleo (VALLILO *et al.*, 1990); a amêndoa apresenta elevadas quantidades de macro e micronutrientes como potássio, fósforo, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobre (VALLILO *et al.*, 1990). Além disso, o teor protéico da amêndoa é superior ao do coco-da-bahia e de outras leguminosas como a ervilha, o feijão-comum, o feijão-de-corda, o grão-de-bico, a castanha-de-caju e a castanha-do-pará (ALMEIDA, 1998). O teor de lipídios na amêndoa (38%) é superior ao da soja (17,7%) e do feijão-amarelo (1,7%), embora seja menor que a da castanha-do-pará (67%) e da castanha-de-caju torrada (47,2%) (ALMEIDA, 1998).



FIGURA 1 - AMENDOAS DO BARU
FONTE: ALMEIDA (1998)

O gênero *Dipteryx* vem sendo estudado em diferentes processos, tais como: a atividade de biomoléculas presentes no fruto com ação antimicrobiana (KLOUCEK *et al.*, 2007) e o consórcio (mistura) das espécies arbóreas, uma delas com o gênero *Dipteryx* no sequestro de carbono (REDONDO-BRENES; MONTAGNINI, 2006). Existem também estudos sobre a composição de sua polpa e semente do baru (*Dipteryx alata* Vog.), já que este fruto se prolifera na região do Mato Grosso do Sul, Planalto Central e precisamente no norte de Minas Gerais, Goiás e centro de Mato Grosso, até a costa atlântica do Maranhão (CANDIL, 2004; ARAKAKI, 2004). Tal fato demonstra o seu potencial, já que o mesmo apresenta valores nutricionais consideráveis para a alimentação humana.

Estudos realizados por Vallilo *et al.* (1990) com sementes de *Dipteryx alata* Vog., subfamília Faboideae, revelaram significativo valor calórico (560 kcal/100g), lipídico (41,65%) e protéico (23,45%). O óleo apresentou o ácido oléico (C18:1) como principal componente (50,17%), seguido de linoléico (30,70%). A soma de ambos confere ao óleo alto grau de insaturação, similar ao azeite de oliva.

Dessa forma, o potencial da espécie e sua valorização, exige complemento na busca de novas alternativas no meio científico/industrial, como por exemplo, isolar microrganismos capazes de acumularem micronutrientes essenciais para os seres vivos, e que destinará até mesmo para a conservação e cultivos das mesmas na região de Cerrado.

2.3 MICRONUTRIENTES

Os micronutrientes também são chamados de oligoelementos ou elementos traço, podendo ser encontrado em pequenas proporções no organismo e geralmente expressos em ppm ou mg/kg de peso vivo (ORTOLANI, 2002).

2.3.1 Zinco

O zinco é componente de algumas metaloenzimas tais como superóxido-dismutase, anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidase, fosfatase alcalina, DNA e RNA polimerases, com efeitos nos metabolismos dos carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (NRC, 2001).

De acordo com McDonald *et al.* (2002), o elemento está presente em mais de setenta enzimas. O local de absorção de zinco em animais não-ruminantes é o intestino delgado (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999) e nos ruminantes é no rúmen (NRC, 2001). A principal via de excreção é pelo fígado através das fezes, com pequenas quantidades eliminadas pela urina, onde a quantidade de zinco endógeno excretado pelas fezes é influenciado pelas necessidades do animal (MCDOWELL, 1992). A principal forma de

armazenamento do zinco é como metalotioneína no fígado. Sua síntese é induzida pela presença do elemento no fígado (MCDOWELL, 1992).

Para se verificar a deficiência deste mineral pode ser usada a determinação de sua concentração no plasma, ou pelo indicador alternativo, nesse caso a metalotioneína, proteína sintetizada pelo fígado que se une ao zinco (GONZÁLEZ; SILVA, 2003).

2.3.1.1 Funções do zinco

O zinco tem função relacionada em sistemas enzimáticos envolvidos com o metabolismo dos ácidos nucleicos, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos. Em tecidos com rápido crescimento, a deficiência de zinco reduz a síntese de DNA e RNA impedindo a divisão e o crescimento celular. As proteínas contendo zinco estão envolvidas na transcrição e translação do material genético (MCDOWELL, 1992). Underwood e Suttle (1999) citam a função do zinco na constituição da carboxipeptidase, que é responsável pela hidrólise de aminoácidos C-terminal de peptídeos. O zinco é componente da timosina, hormônio produzido pelas células do timo que regula as células imunomediadas (NRC, 2001). O zinco participa na produção, armazenagem e secreção de hormônios, bem como ativador de receptores e resposta de órgãos.

Entre os principais efeitos do zinco na produção e secreção de hormônios estão relacionados com a testosterona, insulina e corticóides da adrenal (MCDOWELL, 1992). É constituinte da anidrase carbônica, atuando no equilíbrio ácido-base. A reação se dá pela captação do CO_2 e sua posterior liberação na forma de HCO_3^- .

2.3.1.2 Interações do zinco com outros elementos

A absorção do zinco pode ser afetada pela interação exercida por outros elementos como cálcio, cobre e ferro. Porém, a sua absorção pode ser favorecida pelo magnésio, fosfatos e vitamina D (MCDOWELL, 1992). Van Soest (1994) comenta do possível aumento da indisponibilidade do zinco por altas quantidades de fitato no alimento. O autor cita que tal fato pode ser causa da deficiência em não-ruminantes, pois

o fitato se liga ao mineral tornando-o indisponível. Provavelmente não ocorre em ruminantes e outros animais com fermentação pré-gástrica, onde acontece decomposição quase completa desse complexo, liberando o zinco para absorção. Porém, González e Silva (2003) consideram que a deficiência por complexação com fitatos, possa ocorrer em ambos.

2.3.2 Cobre

A mais importante deficiência de origem mineral depois do fósforo, talvez seja a de cobre. O desenvolvimento da deficiência desse elemento depende tanto da sua concentração na dieta como das concentrações dos antagonistas que interferem com a absorção e a subsequente utilização para os processos metabólicos (VASQUEZ *et al.*, 2001).

O cobre está presente no sítio ativo de algumas enzimas que catalisam reações orgânicas oxidativas. O cobre proveniente dos alimentos apresenta pequena disponibilidade, ao redor de 4%, sendo que está intimamente ligado à forma química na qual se encontra este microelemento e sua solubilidade (ORTOLANI, 2002).

O cobre é transportado do fígado para os órgãos periféricos pela ceruloplasmina, que atua como armazenadora e transportadora para manter a homeostase desse elemento (GONZÁLEZ; SILVA, 2003). Aproximadamente 95% do cobre no plasma de mamíferos está na forma de metaloproteínas como a ceruloplasmina, que o carrega para tecidos específicos (MCDOWELL, 1992).

A ceruloplasmina (cobre mono amino oxidase, Cu-MAO) é uma fração alfa-2 globulina do sangue, em que cerca de 95% do cobre sérico encontra-se ligado. A ceruloplasmina contém três oligosacarídeos ligados por asparagina e oito sítios que ligam o Cu^+ ou Cu^{2+} . Ajuda também na manutenção da homeostase do Cu^{2+} e serve no transporte de Cu^{2+} (SMITH *et al.*, 1988). Para se detectar estados de carências, González e Silva (2003) comentam que a determinação de ceruloplasmina plasmática ou da enzima superperóxido dismutase dos eritrócitos possuem uma alta correlação com os níveis sanguíneos de cobre.

2.3.2.1 Funções do cobre

O cobre é componente de várias enzimas, como a citocromo oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica; lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina; superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio (NRC, 2001). É parte da citocromo-oxidase, enzima oxidase terminal na cadeia respiratória, que catalisa a redução de O_2 para água, passo essencial na respiração celular (MCDOWELL, 1992). Por estar envolvida no mecanismo de oxidação, sua deficiência leva a transtornos no metabolismo oxidativo, podendo manifestar-se de múltiplas formas.

Com a deficiência de cobre ocorre uma falha na formação de colágeno, onde atua a enzima lisil-oxidase, que contém cobre. Essa enzima permite a ligação cruzada entre fibras de colágeno, onde essa ligação confere rigidez estrutural e elasticidade (MCDOWELL, 1992). Sabe-se que, na deficiência de cobre, diminui a atividade da superóxido dismutase, que é uma cupro-enzima que catalisa o O_2 - para H_2O_2 , que é o grupo oxidante que participa nas reações de defesa dos neutrófilos (BABIOR *et al.*, 1973).

2.3.2.2 Interações do cobre com outros elementos

Há efeitos adversos em aumentar o molibdênio e enxofre dietéticos sobre a utilização de cobre por ruminantes, que têm sido atribuídos à formação de tiomolibdatos (TMs) no ambiente ruminal rico em sulfeto. Os efeitos sistêmicos dos TMs envolvem principalmente a inibição do metabolismo do Cu^+ (MILTIMORE; MASON, 1971). Os TMs ligam-se com o cobre, no rúmen, para formar cupro-tiomolibdatos (Cu-TMs) que são insolúveis e indisponíveis para a absorção (MASON, 1990). Os Cu-TMs associam-se às proteínas de alto peso molecular, principalmente albumina e formam um complexo insolúvel e, assim, reduz-se a absorção cúprica. O efeito fisiológico importante da formação do complexo Cu-TMalbumina na corrente sangüínea relaciona-se à restrição da disponibilidade de Cu para síntese de ceruloplasmina (VASQUEZ *et al.*, 2001). De

acordo com Ortolani (2002), o ferro pode diminuir a disponibilidade do cobre por competição do mesmo sítio ativo de absorção intestinal. Os resultados de Marques *et al.* (2003) mostraram baixos teores de cobre encontrados no fígado de animais acometidos pela carência deste mineral. A principal causa da carência de cobre no estudo parece ser os altos teores de ferro nas pastagens e na água.

2.4 BIOSSORÇÃO E ACUMULAÇÃO INTRACELULAR

A bioissorção pode ser definida como uma ação microbiana que ocorre por meio da adsorção de espécies metálicas, valendo-se de mecanismos físico-químicos na superfície celular. Em células vivas, a atividade metabólica também pode influenciar esse processo por causa da mudança do pH, nutrientes orgânicos e inorgânicos e dos metabólitos produzidos. Além da sorção que acontece nas superfícies celulares, algumas espécies catiônicas podem ser acumuladas dentro das células, via sistemas de transporte de membrana, variando de acordo com a afinidade e com a especificidade. Uma vez dentro das células, as espécies metálicas podem ser ligadas, precipitadas, localizadas dentro de estruturas ou organelas celulares, dependendo do elemento e do microrganismo (ECCLES, 1995; GADD, 1993).

2.4.1 Processos utilizados pelos microrganismos para remoção de metais pesados

Alguns dos processos por meio dos quais os metais podem ser removidos dos efluentes, pela presença de microrganismos, utilizando os referidos processos de imobilização ou detoxificação, por meio da bioissorção e da bioacumulação, foram apresentados em itens anteriores.

Sabe-se que na bioissorção a acumulação de metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular, se dá por interações físico-químicas entre o metal e os compostos constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e, ainda, outros materiais associados à face externa da membrana celular.

A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário um gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer usando tanto células vivas quanto células mortas (GADD, 1993). Por outro lado, na bioacumulação o transporte dos metais pesados através da membrana celular e sua acumulação intracelular são dependentes do metabolismo, ou seja, ocorrem somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção de íons metálicos por este tipo de mecanismos é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físicoquímico. Em contrapartida maiores quantidades de metal podem ser acumuladas (GAD, 1999).

A necessidade de fontes de energia, a presença de inibidores metabólicos, a temperatura e a luminosidade são os principais fatores que afetam este tipo de acumulação (GAD, 1990; TING *et al.*, 1989). Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação de metais pesados são pouco conhecidos. Uma das possibilidades relacionadas ao acúmulo de metais seria a de que os metais pesados podem ser captados pelos sistemas de transporte intracelular que são essenciais para o desenvolvimento microbiano. Uma vez dentro da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou podem estar ligados a proteínas, deslocando os íons adequados ao funcionamento celular de suas posições originais, prejudicando, assim, as funções metabólicas.

A Figura 2 mostra um esquema sobre os mecanismos de interação entre metais e células microbianas.

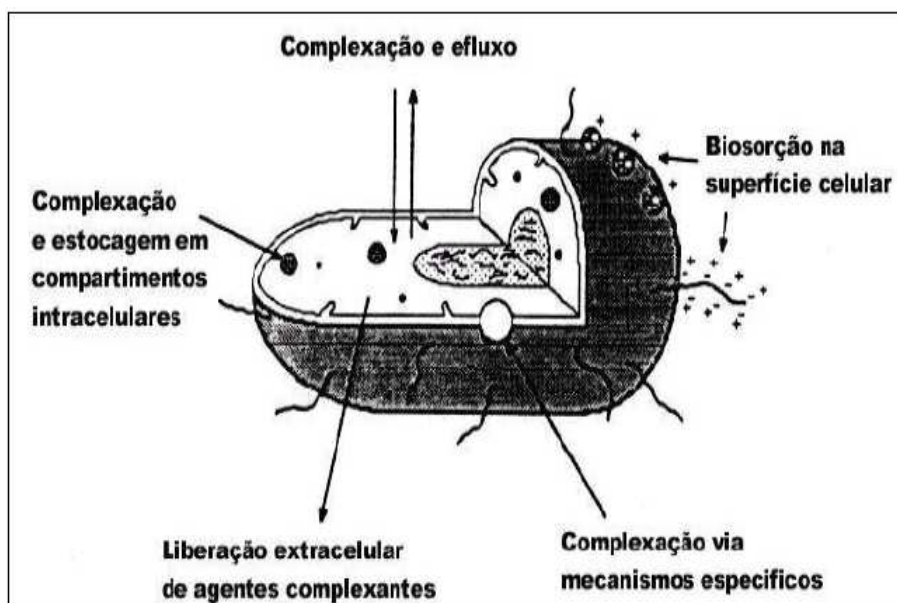


FIGURA 2 - MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE METAIS E CÉLULAS MICROBIANAS

FONTE: BIRCH e BACHOFEN, 1990.

Existem autores que sugerem como tecnologia alternativa, o emprego de biosurfactantes produzidos pelas bactérias, leveduras e fungos filamentosos, os quais poderiam ser usados para a remediação ambiental de metais pesados de solos, superfícies e águas subterrâneas (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

2.4.2 Microrganismos capazes de absorver metais

Dentre os microrganismos estudados, a célula fúngica é, essencialmente, uma célula eucariótica típica e compartilha, portanto, semelhanças entre células animais e vegetais (TORTORA *et al.*, 2000). Uma das características que diferencia as células microbianas de organismos usados em processos biossorbitivos, tais como, bactérias, fungos e algas, em relação às células animais é a presença de uma barreira, a parede celular, que funciona como envoltório externo. A parede protege os microrganismos contra as adversidades do meio, controla o fluxo entre o citoplasma e suas vizinhanças e determina a forma e rigidez da célula. A parede celular é considerada o esqueleto externo da célula (chamada, por isso, de exoesqueleto). Por estar em contato direto com o meio

externo, a parede interage especialmente com substâncias solúveis no meio extracelular (KUYUCAK; VOLESKY, 1990).

A parede celular fúngica consiste em uma estrutura estratificada composta de microfibrilas de quitina, as quais estão embebidas em uma matriz de pequenos polissacarídeos, proteínas, sais inorgânicos e pigmentos. As proporções dos componentes da parede celular variam, grandemente, de fungo para fungo. A quitina é um polímero de N-acetil-D-glicosamina (NAG). O NAG é produzido no citoplasma pela transferência do NAG da uridinadifosfato-NAG para cadeias de quitina, pela ação da enzima quitina sintetase, que se localiza em organelas denominadas quitossomos (TORTORA *et al.*, 2000).

Os principais polissacarídeos da matriz da parede celular consistem de glicanos não-celulósicos, tais como: compostos glicogenóides, mananos (polímeros de manose), quitosana (polímeros de glicosamina) e galactanos (polímeros de galactose). Pequenas quantidades de fucose, xilose e ácidos urônicos podem estar presentes (TRABULSI *et al.*, 1999).

A parede celular é considerada um complexo trocador de íons, similar a uma resina. A capacidade de troca iônica depende da presença de grupos funcionais e da estrutura espacial da própria parede celular. Dentre os principais grupos funcionais responsáveis pelos mecanismos de captação de cátions de metais podemos citar: a carboxila, sulfato e fosfato, sejam por atração eletrostática ou por formação de ligações. Portanto, essa interação pode ser particularmente pronunciada no caso de cátions metálicos, devido às características aniônicas da parede celular (APARICIO, 2000; VEGLIÓ *et al.*, 1997).

A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acumulação, variam de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a linhagem. As células microbianas têm potencial para remover metais de soluções, empregando metabólitos excretados, parede celular e polissacarídeos. Fatores externos, como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação (BOLTON; GORBY, 1995; GALUN *et al.*, 1987; MULLEN *et al.*, 1989; GAD, 1990).

Nos trabalhos de Volesky e Holan (1995) e de Kapoor e Viraraghavan (1995), nos quais foi realizado um levantamento dos microrganismos com capacidade para remover metais pesados, percebe-se que fungos como *Rhizopus arrhizus*, *Absidia orchidis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nonatum*, *Penicillium chrysogenum* e

Saccharomyces cerevisiae apresentaram um bom potencial de remoção de metais como urânio, tório, chumbo, ouro, cobre e cádmio, entre outros. Em pesquisas mais recentes *Mucor rouxii* também foi apontado como um fungo promissor. Por outro lado, bactérias como *Bacillus subtilis*, *Citrobacter* sp e *Streptomyces longwoodensis* foram as que tiveram posição de destaque. Sabe-se que fungos filamentosos e leveduras possuem a capacidade de acumular micronutrientes, tais como Cu, Zn, Co, Cr e Mn e metais que não fazem parte da sua dieta nutricional como U, Ni, Cd, Sn e Hg, em quantidades maiores do que as do requerimento nutricional, no que tange aos primeiros. Sabe-se também que existem parâmetros importantes para estimular o processo de remoção com microrganismos, dentre os quais podemos destacar: a fonte de carbono, a temperatura e o pH. É importante dizer que o pH do meio afeta o processo adsorptivo e/ou bioacumulativo, uma vez que influencia a disponibilização ou não do metal na sua forma solúvel, bem como interfere na carga da superfície microbiana. Parece que, para alguns microrganismos, a elevação do pH favorece a remoção de metais como o Cu e Zn, por exemplo. No entanto, o emprego de valores de pH acima de 5 promoveria a precipitação do cátion, inviabilizando a sua remoção. Por outro lado, o abaixamento do pH conduziria à obtenção de biomassas carregadas positivamente devido à alta concentração de prótons, inibindo, concomitantemente, a ligação dos íons metálicos, por causa da repulsão de cargas.

Price *et al.* (2001), trabalhando com rejeito líquido da suinocultura, contendo elevados teores de cobre e zinco, observaram que os metais podiam ser acumulados em níveis fitotóxicos em solos utilizados para a agricultura, na Carolina do Norte. Sabe-se que tais rejeitos contêm níveis elevados dos referidos metais devido à sua abundância na alimentação suína. O referido trabalho tinha como objetivo avaliar o potencial de diferentes fungos, devido à sua capacidade em remover cobre e zinco de rejeitos oriundos da suinocultura. Desta forma, *Aspergillus niger* foi apontado como aquele que apresentou maior potencial para esse propósito. Assim sendo, *A. niger* foi capaz de crescer em placas de Petri adicionadas de cobre, em um nível cinco vezes superior ao inibitório para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi também evidenciada a capacidade de bioacumulação de zinco por *A. niger* para detoxificar o ambiente contaminado. Essa propriedade do fungo não tinha sido explorada anteriormente na biorremediação de metais. Os resultados mostraram que *A. niger* foi capaz de remover 91% de cobre e 70% de zinco do efluente tratado.

De acordo com Yan e Viraraghavan (2003), a bioissorção de chumbo, cádmio e zinco por biomassa viva e morta de *Mucor rouxii*, tratada com NaOH, foi estudada numa determinada faixa de pH. No caso da biomassa morta, o pH baixo resultou em um decaimento na capacidade de bioissorção. Foi observado que em pH 3.0 ou em valores menores, a inibição da bioissorção dos íons metálicos começou a ser notada. Por outro lado, em valores de pH 4.0 ou superiores, a bioissorção de íons metálicos aumentou nitidamente, atingindo em pH 5.0 valores de absorção de 25,22; 16,62; 8,36 e 6,34 mg/g para Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente. Os melhores resultados foram alcançados ao empregar um pH igual a 6.0, atingindo 53,75; 53,85; 20,31 e 20,49 mg/g para absorção de Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente. Por outro lado, a biomassa viva teve uma capacidade de bioissorção de 35,69; 11,09; 8,46 e 7,75 mg/g em pH 5.0 para Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente.

É importante ressaltar que, na presença de dois ou mais metais, a capacidade de bioissorção individual de um íon metálico foi reduzida. Contudo, a capacidade total de absorção aumentou, indicando a possibilidade da biomassa de *M. rouxii* adsorver mistura de íons metálicos. Além do mais, a biomassa de *M. rouxii*, cultivada em diferentes meios de cultura exibiu o mesmo potencial de adsorção de íons metálicos, independentemente do meio em que foi cultivado. Os íons metálicos adsorvidos pela biomassa foram eluídos efetivamente com HNO_3 , enquanto a água destilada apresentou uma capacidade de eluição desprezível. A regeneração da biomassa com NaOH promoveu a recuperação da sua capacidade de bioissorção, mesmo depois de cinco ciclos de adsorção-eluição-regeneração.

Recentemente, Farias e Lemos (2008) selecionaram linhagens fúngicas que apresentam capacidade de remoção de cobre, zinco e manganês, empregando galactose, maltose e xilose como fontes de carbono. Foram testadas as seguintes linhagens de fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2.5 ORGANISMOS CAPAZES DE ACUMULAR ZINCO E COBRE

A alta capacidade de ligação a metais e a capacidade de acúmulo está presente em uma variedade de organismos e materiais biológicos que têm sido apresentados na literatura, como pode ser observado na Tabela 1.

Dentre os biosorventes estão as algas marinhas, as bactérias, as leveduras, os fungos e resíduos de micélios de fermentações de alimentos ou apenas para redução dos níveis tóxicos no meio ambiente. É importante ressaltar que os microrganismos são utilizados na produção de biomassa, sendo considerados fontes de proteínas.

TABELA 1 - ACÚMULO DE ZINCO E COBRE PELA BIOMASSA DE VÁRIOS ORGANISMOS

Organismos estudados	Processos de incorporação	mg/kg ⁻¹ peso seco de biomassa	Referência
Cianobactérias			
<i>Oscillatoria anguistissima</i>	Adsorção	641.000 (zinco)	Ahuja <i>et al.</i> , 1999
Fungos			
<i>Penicillium. digitatum</i>	Adsorção	9.700 (zinco)	Galun <i>et al.</i> , 1987
<i>Mucor. rouxii</i> / Tratamento com NaOH	Adsorção	34.580 (zinco)	Baik <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizopus oryzae</i> Tratamento com NaOH	Adsorção	35.880 (zinco)	Baik <i>et al.</i> , 2002
Bactérias			
<i>Streptomyces noursei</i>	Adsorção	1.600 (zinco)	Mattuschka e Straube 1993
<i>Streptomyces rimozus</i> / Tratamento com NaOH	Adsorção	80.000 (zinco)	Mamerin <i>et al.</i> , 1999
Leveduras			
<i>Botrytis cinerea</i>	Adsorção	12.980 (zinco)	Akar e Tunali, 2005
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Adsorção/Absorção	104 (zinco)	Krogh <i>et al.</i> , 1998
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adsorção/Absorção	700 (zinco)	Stehlik-Thomas <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida spp</i>	Absorção	25 a 300 de cobre	Dönmez <i>et al.</i> , 1999
<i>Pichia guilliermondii</i> W. NRRLY27063	Absorção	96.030 (zinco)	Roepcke, 2007
<i>Kluyveromuces marxianus</i>	Absorção	25 a 300 de cobre	Dönmez <i>et al.</i> , 1999
Plantas			
<i>Spartina townsendii</i>	Adsorção	36.000 (zinco)	Doyle e Otte, 1997
<i>Atriplex portulacoides</i>	Adsorção	190.000 (zinco)	Doyle e Otte, 1997
Folhas de <i>Tectona grandis</i>	Adsorção	16.420 (zinco)	Prasanna Kumar <i>et al.</i> , 2006

2.6 LEVEDURAS ACUMULADORAS DE METAIS

2.6.1 Leveduras

As leveduras são microrganismos reconhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica. São definidas como fungos, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e o crescimento vegetativo ocorre por brotação ou fissão ou a interação de ambos. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume (LACHANCE; STARMER, 1998).

As leveduras são fungos unicelulares, não-filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente encontradas na natureza com o aspecto de um pó branco cobrindo folhas e frutas. Torrezan *et al.* (2000) confirmaram que existe microbiota contaminante das frutas (parte externa), sendo a parte interna estéril, e se caso existir uma contaminação, é porque houve ruptura em alguma parte da casca. Leveduras são encontradas em ecossistemas marinhos e de manguezais onde sua ocorrência está associada nos ecossistemas marinhos (HYDE, 2002; AGLER; AHEARN, 1987).

A microbiota de frutos pode variar muito dependendo exclusivamente das condições da matéria-prima e da lavagem a qual esta é submetida, além das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, equipamentos e ambiente industrial em geral. O pH destes produtos não favorece, em geral, a proliferação de microrganismos, principalmente os patogênicos (SIQUEIRA; BORGES, 1997), podendo haver apenas desenvolvimento de microrganismos deteriorantes como bolores, leveduras, bactérias lácticas e outros microrganismos ácido tolerantes como bactérias acéticas, *Zymomonas* e algumas espécies de *Bacillus* (TORREZAN *et al.*, 2000).

As leveduras são comuns também em ambientes subtropicais, água do mar, estuários e água doce, com prevalência das formas oxidativas, estando presentes em alto número em águas menos salgadas. As espécies encontradas onde ocorre poluição doméstica estão geralmente associadas com animais, enquanto outras espécies são associadas com madeira e solo (WOOLLETT; HENDRICK, 1970). Em locais onde ocorre poluição doméstica há uma prevalência de espécies fermentativas. Existe uma prevalência de leveduras estritamente aeróbicas em águas não poluídas e de leveduras fermentativas em águas poluídas (WOOLLETT; HENDRICK, 1970).

Dentre as leveduras estão *Pichia spartinae*, *Kluyveromyces aestuarii* e *K. drosophilum*, isoladas de água salgada, estuário e sedimento de manguezal na Flórida, USA (AHEARN *et al.*, 1968; MEYERS; AHEARN, 1974), espécies de *Metschnikowia* com invertebrados marinhos, *Debaryomyces hansenii* com água do mar (KOHLMAYER;

KOHLMEYER, 1979) e várias leveduras basidiomicéticas (FELL, 1974). As leveduras podem está envolvidas nos habitats marinhos na decomposição, na ciclagem de nutrientes, na biodegradação de compostos xenobióticos, como petróleo e seus derivados, e como parasitas (MEYERS; AHEARN, 1974). O baixo nível de oxigênio acarreta alta proporção de leveduras fermentativas em águas poluídas por esgotos domésticos. As leveduras fermentativas podem ser bons indicadores de poluição doméstica e contaminação fecal principalmente *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* que são espécies isoladas com frequência de águas poluídas por esgotos domésticos e de fontes humana e animal (WOOLLETT; HENDRICK, 1970).

As leveduras com pigmento carotenóide foram utilizadas como indicadoras de poluição pela primeira vez por van Uden e Fell (1968). Embora exija contraposição, essas leveduras não parecem ser representativas em outros estudos, pois as mesmas não são correlacionadas com nenhum fator de poluição.

Historicamente, as leveduras estão associadas a processos fermentativos que contenham açúcares. Entretanto, a habilidade das leveduras em assimilar grande número de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e de ocupação dos nichos ecológicos que contenham estes compostos (PHAFF; STARMER, 1987).

Estes microrganismos são cultivados em destilarias para produção de etanol a partir do açúcar da cana. São também cultivados a partir do melaço da cana-de-açúcar para serem usadas na fabricação de pães. Assim, são de extrema importância para a produção de álcool (álcool combustível e bebidas alcoólicas), além de outros produtos de grande interesse industrial (RAVANELI *et al.*, 2006) para a saúde e alimentação animal.

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, bicomcombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína

microbiana (*SCP – single cell protein*) e 600.000 toneladas de fermento de pão (PRETORIUS *et al.*, 2003).

As leveduras podem ser mantidas pela transferência seriada para meios de culturas frescos. Este método, embora simples, é laborioso, consome um tempo relativamente grande, além de ser economicamente inadequado, sendo útil apenas para coleções de cultura não muito numerosas, destinadas ao uso na rotina (SMITH, 1991).

Ao longo dos anos, vários métodos de preservação têm sido desenvolvidos, desde a contaminação até a perda de viabilidade, visando a eliminação dos problemas encontrados em transferências seriadas (ASHCAR *et al.*, 1988; GIRÃO *et al.* 2004; HOFFMANN, 1999; KWON – CHUNG; BENNETT, 1991; ODDS, 1991; RODRIGUES *et al.*, 1992). O principal objetivo da preservação de culturas é a extensão do tempo de sobrevida das cepas armazenadas.

Métodos que têm apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial. Isso pode ser conseguido através da desidratação ou congelamento, onde se utiliza meios pobres para o desenvolvimento dos fungos, incubando-se em baixas temperaturas ou em baixa tensão de oxigênio (GENTLES; SCOTT, 1979; KIRSOP; SNELK, 1984).

2.6.2 Aspectos metabólicos

As leveduras podem metabolizar varias fontes de carbono, mas utilizam principalmente açúcares, dentre eles, sacarose, glicose e maltose. Algumas leveduras podem usar uma série de fontes não convencionais de carbono, como os biopolímeros, pentoses, alcoóis, polióis, hidrocarbonetos, ácidos graxos e os ácidos orgânicos (BEKATOROU *et al.*, 2006; FERREIRA, 1995).

De acordo com Bekatorou *et al.*, (2006) a maioria das cepas de leveduras são capazes de assimilar diretamente íons de amônio e uréia, entretanto, poucas espécies possuem a capacidade de utilizar nitratos como fonte de nitrogênio. O fósforo e o enxofre são geralmente assimilados na forma de íons inorgânicos de fosfatos e sulfatos, respectivamente. Além disso, os metais são essenciais para estes microrganismos.

O crescimento das leveduras, como organismos heterotróficos, depende de uma variedade de compostos orgânicos e alguns nutrientes minerais. Estes compostos são degradados por um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior da célula (o metabolismo). Durante o crescimento, as células utilizam os substratos de forma a satisfazer a síntese de material celular, energia (através da ATP) e poder redutor (forma de nucleotídeos de piridina NADH) expresso no potencial de oxido-redução. Num meio aeróbio, o poder redutor é convertido em energia adicional através de um processo chamado fosforilação oxidativa (BEKATOROU *et al.*, 2006; FERREIRA, 1995).

2.6.3 Bioacúmulo de metais por leveduras

As leveduras são conhecidas por sua habilidade em acumular metais de soluções aquosas através de interações físico-químicas, como a adsorção e a absorção, ou através de mecanismos dependentes do metabolismo. A célula da levedura, com sua complexa parede celular, representa um sítio adicional de adsorção em relação às células desprovidas de parede (GADD, 1990). Este processo depende da disponibilidade de grupos funcionais na superfície da célula e da natureza do metal. Entre os fatores que influenciam na seletividade da captura do metal estão a concentração de íons livres, a eletronegatividade do ligante, o cátion metálico, e a carga do ligante.

A estrutura da parede celular e o estado metabólico da célula dependem da composição do substrato, logo o crescimento em diferentes meios é capacidade e seletividade da captura do metal. Estas características podem ser potencializadas através da criação de novos sítios de ligação ou de variados sistemas enzimáticos no interior da célula (ENGL; KUNZ, 1995).

A levedura *S. cerevisiae* é um poderoso modelo na investigação dos mecanismos de captura de metais. Seu sistema de transporte consiste em transportadores de baixa e alta afinidade. Os transportadores de alta afinidade são seletivos para seus metais alvo e são finamente regulados de acordo com o metal desejado. Já os transportadores de baixa afinidade têm baixa participação na reposição das necessidades dos metais e são menos seletivos com relação aos metais a serem transportados (RADISKY; KAPALN, 1999). *S.*

cerevisiae possui múltiplos transportadores de zinco que permitem a absorção do zinco (GAUDREAU *et al.*, 2001).

Um aspecto pertinente à captura do metal, como por exemplo, o de zinco, por leveduras é que este mecanismo, como para qualquer íon metálico sozinho, é mediado por dois ou mais sistemas substrato específicos. A razão para este fato ainda é desconhecida (EIDE, 1997).

A homeostase do zinco em leveduras, na figura 3, é realizada através dos transportadores de membrana Zrt1p e Zrt2p. Uma vez dentro do citoplasma, o metal se liga às metaloproteínas ou é transportado para organelas, como as mitocôndrias. Em células com alta concentração de zinco em seu interior, os transportadores Zrt1p e Zrt2p transportam o zinco para o interior dos vacúolos, onde ele é armazenado em uma forma menos tóxica. O fator de transcrição Zap 1 p é reprimido por uma concentração intracelular do zinco lábil. Quando o zinco se torna limitante, a atividade de Zap 1p, aumenta a transcrição dos genes dos transportadores ZRT1, ZRT2 e ZRT3. A expressão intensificada do transportador Zrt3p mobiliza o transporte do zinco presente nos vacúolos para o citoplasma para abastecer a quantidade de zinco lábil. Paradoxalmente, o gene ZRC1, também é induzido pelo Zap1p, o que sugere uma necessidade na manutenção do fluxo de zinco através dos vacúolos em células com limitações de zinco. Se o nível de zinco celular aumentar até níveis extremamente altos, ou seja, quando as células com deficiência neste metal forem expostas a altas concentrações do mesmo, o zinco intracelular irá sinalizar a endocitose dos transportadores Zrt1p e Zrt2p. Estas proteínas são subsequenteiramente degradadas no vacúolo. Logo, a homeostase do zinco representa um balanço entre estes sistemas de regulação da transcrição e pós-translação e as proteínas transportadoras que eles controlam (GITAN *et al.*, 1998).

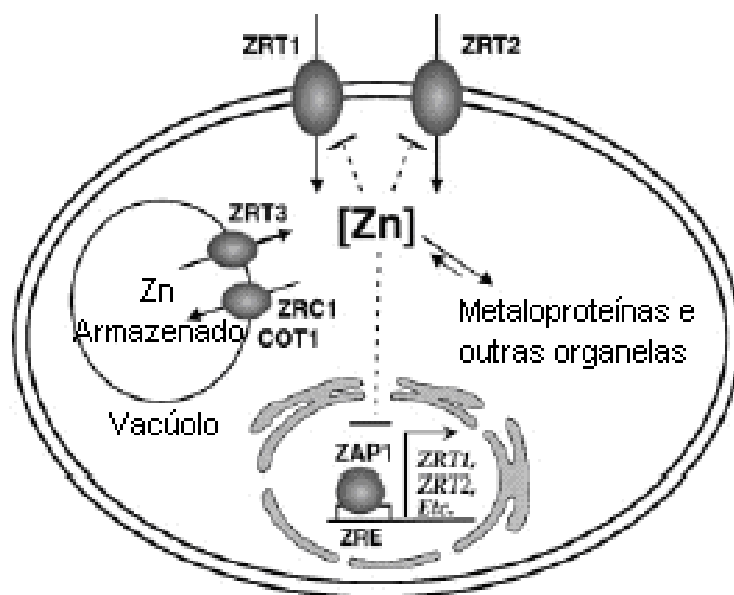


FIGURA 3 - HOMEOSTASE DO ZINCO EM LEVEDURAS
FONTE: MARCDIARMID *et al.*, 2000.

De acordo com Brady e Duncan (1994), as leveduras acumulam metais através de dois processos distintos. No primeiro, existe uma rápida etapa inicial de acúmulo que é independente do metabolismo e da temperatura, e está relacionada com a ligação dos cátions na superfície da parede celular. Os metais são retidos na parede celular e subsequentemente adsorvidos em sítios de ligações aniônicas presentes na estrutura da célula. Este processo de captura é independente do ciclo metabólico biológico, é conhecido como biosorção ou “captura passiva”. A biosorção é reversível, e tem como vantagem a desorção dos metais ligados (VOLESKY; MAY-PHILLIPS, 1995; YAZGAN; OZCENGIZ, 1994; GAUDREAU *et al.*, 2001). Volesky e May-Phillips (1995) sugeriram que as diferenças na capacidade da ligação de metais na superfície do microrganismo devem-se às diferenças na estrutura da parede celular.

Esta etapa pode ser sugerida por um segundo processo, que é dependentemente do metabolismo do microrganismo, é mais lento, e pode acumular quantidades maiores de cátions do que o primeiro processo (BRADY; DUNCAN, 1994). Os metais atravessam a membrana celular, penetrando no interior da célula, através do ciclo metabólico da mesma. Este processo de captura do metal é conhecido como absorção ou “captura ativa”.

Quando o metal é capturado tanto de forma passiva ou ativa pelo microrganismo, este processo é chamado de bioacumulação (VOLESKY; MAY-PHILLIPS, 1995). Brady e Duncan (1994) demonstraram que somente quando a maioria dos sítios de ligação catiônicos, presentes na parede celular, está ocupada, é que se inicia o processo de acúmulo do cátion do metal no interior da célula da *S. cerevisiae*.

A maioria dos metais intracelulares encontra-se ligado a grânulos de polifosfato localizados no interior da célula, localizados dentro ou próximos de vacúolos, ou ligados a proteínas de baixo peso molecular, conhecidas como metaloproteínas ou fitoquelatinas (VOLESKY; MAY-PHILLIPS, 1995; YAZGAN; OZCENGİZ, 1994; GUERINOT; EIDE, 1999). Ksheminska *et al.* (2005) demonstraram a formação de estruturas similares no interior da célula e o aparecimento de grânulos de coloração escura encontrados em regiões conhecidas como vacúolos, quando estudada a bioacumulação de cromo pela cepa *P. guilliermondii* ATCC 201911, através de microscopia eletrônica.

A maioria dos estudos onde ocorre a absorção de metais utilizando microrganismos na etapa do crescimento descreve o processo como sendo bifásico, isto é, uma fase inicial rápida de biosorção, seguida por uma etapa mais lenta, ativa e dependente do metabolismo, que é a absorção (MALIK, 2004).

2.6.4 Fatores que influenciam o bioacúmulo de metais por células de leveduras

O acúmulo de metais por leveduras é influenciado por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal, fisiologia da célula e condições do ambiente, dentre elas destacam-se, pH e temperatura.

O nitrogênio orgânico, como por exemplo, o extrato de levedura permite que a célula apresente uma melhor ligação com o zinco, o qual é primeiramente adsorvido e depois absorvido, tornando-se orgânico (SANTUCCI *et al.*, 2003).

Grupos de enxofre (para metais pesados) e adição de cisteína poderão auxiliar na biosorção de biomassas com alguns outros metais (ENGL; KUNZ, 1995). Além disso, a internalização depende de metabolismo dos íons metálicos, e pode ser influenciada pela presença de cátions de metais competidores, ou pela falta de fonte energética (STOLL; DUNCAM, 1996).

Apesar do alto poder de biosorção de vários tipos de biomassa microbiana morta/pré-tratada ter sido relatado, sua aplicabilidade ainda deve ser testada. Os métodos de biosorção são sensíveis a condições do ambiente, como pH, força iônica e a presença de ligantes orgânicos e inorgânicos. Na maioria dos estudos onde se utilizou biomassa morta de microrganismos para o acúmulo de metais, estes foram levados até o interior da célula; ficando adsorvidos na superfície da célula, e assim, apenas do cátion do metal uma pequena fração da capacidade de bioacumulação foi explorada (MALIK, 2004).

Já a aplicação de células ativas e em crescimento pode ser uma melhor poção, devido à sua habilidade em e auto-abastecer; ao seu seqüestro contínuo metabólico de metais após a adsorção física; e ao seu potencial na otimização, através do desenvolvimento de espécies resistentes e modificação da superfície celular. Além disso, as células metabolicamente ativas que se encontram na fase de crescimento exponencial provavelmente apresentam uma alta concentração de enzimas, sendo que algumas delas podem estar envolvidas na complexação e ligação de íons metálicos (KRAUTER *et al.*, 1996).

Apesar disso, existem limitações práticas para a captura de metais utilizando células vivas, como a sensibilidade do sistema a pHs extremos, altas concentrações de metal/sal e necessidades de energia metabólica extrema. Apesar disso, estes problemas podem ser resolvidos através da seleção de cepas e da exploração de resíduos orgânicos, como as fontes de carbono (RADISKY; KAPALN, 1999).

Os metais de transição são essenciais na função de muitas proteínas, tanto pelo fato de facilitarem as reações redoxes como também por estabilizarem a estrutura da proteína. Para adequar-se às necessidades por estes metais, as células possuem numerosos mecanismos para a solubilização e captura de metais do meio extracelular. As células devem, entretanto, simultaneamente proteger a si mesmas dos danos inerentes na versatilidade destes metais, pois as reações redox podem produzir radicais livres tóxicos se as concentrações do metal no ambiente intracelular não forem cuidadosamente reguladas (RADISKY; KAPALN, 1999).

A chave para a maioria das interações entre metal e microrganismo, e para o desenvolvimento de processos, está na resistência do microrganismo ao metal. Ele reage com o metal, é resistente ao mesmo, e, além disso, mantém todas as suas atividades metabólicas. Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de se encontrar uma explicação genética para o fenômeno da resistência dos microrganismos aos metais. O

ponto focado é a análise das cargas cromossômica e extra-cromossômicas, as quais possuem uma relação direta com a resistência a metais (AGATE, 2003).

O isolamento e seleção de cepas resistentes ao metal é uma etapa crucial para superar a principal barreira de uso de células vivas. Incidentalmente, os microrganismos mais resistentes ligam-se substancialmente a uma maior quantidade de micronutrientes, o que é um pré-requisito para aumentar a bioprecipitação/acúmulo intracelular e o desenvolvimento e um processo eficiente. É importante garantir que as células em crescimento possam manter uma capacidade constante de remoção após múltiplos ciclos de bioacumulação/desorção (MALIK, 2004).

Uma forma de tornar um microrganismo mais resistente e eficiente ao acúmulo de metais é através da adaptação de suas células ao aumento progressivo de concentrações maiores de metal (DÖNMEZ; AKSU, 1999). Dönmez e Aksu (2001) adaptaram cepas de *Candida*, isoladas do ambiente, para os metais níquel e cobre, através de subculturas seriadas em meios de cultivo enriquecidos com estes metais. As células adaptadas cresceram bem na presença de altas concentrações do metal, enquanto que as não adaptadas morreram. Além disso, as capacidades específicas de retenção do metal e de remoção das células adaptadas foram maiores do que a das não adaptadas em todas as concentrações testadas.

Segundo Basso *et. al.* (1996) as cepas de levedura são capazes de utilizar muitos compostos nitrogenados, tais como aminoácidos, bases nitrogenadas, uréia e amônio, utilizando-se de vários sistemas de transporte para as diversas fontes.

O nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+) é encontrado no mosto proveniente do caldo de cana, e sua concentração influe sobre o brotamento da levedura e a taxa de multiplicação da levedura além de que a porcentagem de levedo no vinho também está diretamente relacionada com a concentração de NH_4^+ . Segundo Basso, *et. al.* (1996) esta forma de nitrogênio na cana é intermediária, pois o nitrato (NO_3^-) absorvido do solo pela planta é reduzido a nitrogênio amoniacal e este transformado em aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e demais compostos nitrogenados.

Reed (1982) menciona a respeito da necessidade nutricional de leveduras, a importância de vitaminas como a biotina, tiamina, ou outras, que devem ser supridas pelo meio de crescimento. Em experimentos laboratoriais isto é geralmente feito com o uso de extrato de levedura. Em processos comerciais essa suplementação é feita pela adição de compostos minerais solúveis e vitaminas sintéticas, geralmente suplementadas com levedura ou extrato de levedura.

Pinotti (1991) afirma que nas etapas do processo de produção de álcool existem perdas significantes de nutrientes, notadamente o nitrogênio. Devido a estas perdas principalmente na etapa de decantação, ocorre a necessidade da introdução do nitrogênio durante a fermentação, onerando o custo final do álcool.

Basso *et al.* (1996) relata que a acidez resultante da utilização do sulfato de amônio, embora auxilie no controle a contaminação bacteriana (conseqüentemente reduz as formações de ácidos láctico e acético), causa estresse a levedura diminuindo a viabilidade e a sua multiplicação.

Su *et al.* (1969) verificaram que quando a uréia é usada como única fonte de nitrogênio, a levedura produzida apresenta menor teor em proteína e maior produção comparada com o sulfato de amônia.

Abramov *et al.* (1994) enfatizam que a síntese de biomassa celular pela levedura é significativamente dependente do conteúdo em nitrogênio no meio de crescimento, uma vez que a proporção de compostos nitrogenados na célula de levedura atinge 50%. Reforçam o conhecimento de que as células de levedura sintetizam todos os aminoácidos e proteínas a partir de nitrogênio inorgânico e carbono orgânico, e também a partir de produtos intermediários da degradação de carboidratos formados durante a fermentação e respiração.

2.6.5 Exemplos de bioacúmulo de micronutrientes por leveduras

Roepecke (2007) aborda em seu trabalho o desenvolvimento de bioprocessos para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico (96.030 mg/kg) . E, Oliveira (2006) descreve o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio (360, 62 ppm). Ambos os autores determinaram processos para a obtenção de um novo produto, como zinco e selênio orgânicos, para atender principalmente, às agroindústrias.

Os exemplos citados acima são algumas das grandes potencialidades dos microrganismos que anualmente atingem o público consumidor. Neste sentido há importância não só da pesquisa visando à descoberta de novos processos e produtos microbianos, como da identificação, caracterização e manutenção dos microrganismos.

Segundo Manzon *et al.* (2010) o uso da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com cobre é importante para atender as áreas de cosmético, probiótico, nutracêutico e dietética. Contudo, no presente trabalho citado foi necessário inserir várias fontes de nutrientes, tais como aminoácidos, para o processo de bioacumulação, o que encarece mais o produto final.

Comparando com Borun *et al.* (2010) e Yu *et al.* (2010) ambos visam a produção de biomassa de levedura para consumo humano, por isso a técnica em si é mais cara, não sendo viável à ração animal. Dessa forma, ambos os trabalhos citados anteriormente são de biomassas enriquecidas com o cobre ou o zinco, porém apresentam um custo elevado, já que utilizam meios sintéticos, ou são suplementados com vitaminas, aminoácidos, entre outras substâncias.

Fumi *et al.* (2004), Someya e Kuriyama (2008), Sussumu e Kazuhiro (2010) abordam sobre a produção de biomassa de leveduras com cobre e/ou zinco ao consumo humano (alimento) ou para estética (cosméticos), todas elas comprovam que as leveduras são capazes de acumular, porém em processos totalmente diferentes e com a utilização de meios sintéticos como substratos para a fermentação.

Sobre o processo de bioacumulação existem trabalhos que tem como objetivo encontrar um ótimo fator de bioacumulação de cobre em leveduras, utilizando melaço (GÖNEN; AKSU, 2008). Porém, não apresentam o mesmo rendimento de bioacumulação e a mesma quantidade de biomassa final. Isso se deve ao fato que, visam apenas o processo de biorremediação.

2.6.6 Caracterização e identificação de leveduras

Em 1896, foi estabelecido o primeiro sistema de identificação de leveduras. Emil Christian Hansen descreveu características morfológicas e fisiológicas destes organismos, que corroborou para a caracterização de um grande número de espécies. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genética (MARÇAL, 2005).

Prado (2007) aplica em seu trabalho dois métodos de identificação: bioquímico e molecular. Nessa mesma assertiva, em geral, o primeiro é mais barato, o que estimula a

utilização de sistemas de identificação miniaturizados como API (BioMérieux) ou BIOLOG. Contudo, a autora descreve que nas duas últimas décadas, tem-se acompanhado o intenso desenvolvimento de métodos de detecção e identificação com base no DNA.

Uma das principais vantagens destes métodos é sua independência das variações observadas nas condições de crescimento dos microrganismos. Muitos métodos genotípicos são baseados no princípio da PCR (reação em cadeia da polimerase), a qual permite a amplificação seletiva de fragmentos alvo do DNA através do uso de *primers* e sob condições controladas (TEMMERMAN *et al.*, 2004). A técnica de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) em conjunto com PCR tem sido aplicada com sucesso na identificação de muitos microrganismos em nível de espécie (KHALED *et al.*, 1997).

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbonos são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares (MATIENZO, 2002). As leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância; alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente somente por algumas espécies (CARMO DE SOUZA, 1969).

A partir de então, vários estudos relatam a caracterização e identificação de isolados de leveduras utilizando a região espaçadora intergênica, ITS1 e ITS2 do rDNA, em diversas áreas: como fermentação de vinho (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; EGLI; HENICK-KLING, 2001; ESPINOSA *et al.*, 2002); e área de alimentos (HERAS-VAZQUEZ *et al.*, 2002).

2.7 PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES

A fermentação é o método industrial aplicado para a obtenção de diversos produtos. Das técnicas de fermentação, a fermentação submersa (FSm) é a mais utilizada onde os substratos podem ser de diferentes. Fermentação submersa é um método atraente desde que todas as variáveis do processo podem ser facilmente controladas, enquanto na

fermentação em estado sólido, os processos de transferência de massa tais como a difusão de gases e nutrientes, além da temperatura (BOKHARI *et al.*, 2008) são prejudicados.

A fermentação submersa pode ser empregada na sorção (adsorção e/ou absorção) de metais por microrganismos. E isso, tem despertado a atenção de pesquisadores pela capacidade de produção de biomassa microbiana em comparação com outros sorventes inorgânicos e orgânicos, tornando-se mais rápido e barateando o processo (VOSS; THOMAS, 2001).

Tavares *et al.* (1998) afirmam que os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agro-industriais e resíduos derivados de petróleo. Ao se desenvolverem nesses meios os microrganismos consomem a matéria orgânica dos mesmos, promovendo a redução de sua capacidade poluidora. Este fato é constatado pela acentuada redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) e da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

Muitos processos biotecnológicos vêm utilizando com sucesso diversos resíduos agroindustriais e sub-produtos tais como cascas de café, casca e bagaço de frutas, farelo de trigo, bagaço de uva, bagaço de mandioca, bagaço de beterraba doce, melaço de cana de açúcar, melaço de soja e outros que podem ser utilizados como substratos para a produção de compostos de maior valor agregado. Os produtos obtidos são: enzimas, etanol, proteínas, ácidos orgânicos e compostos de aroma, etc. Grandes produtividades podem ser atingidas desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (BLANDINO *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2000; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Dentre os vários subprodutos produzidos a partir da cana-de-açúcar e da soja pela indústria, podemos citar o melaço. Resíduo do processo de cristalização do açúcar no caso da cana-de-açúcar (JACQUES *et al.*, 1999) e da produção de proteína concentrada no caso da soja (LIU, 2004), melaços são muito utilizados em diversos meios fermentativos devido ao seu baixo custo, alto teor de carboidratos e de proteínas, no caso do melaço de soja (CAZETTA *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2003, BERWANGER *et al.*, 2007).

Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos que utilizam melaços como substratos, a exemplo a produção de biomassa de *Candida utilis* (LEE; KIM, 2001), e os trabalhos de acúmulo de metais como Pb^{+2} por *Saccharomyces cerevisiae*

(SKOUNTZOU *et al.*, 2003) e de Cu^{+2} por *Saccharomyces cerevisiae* (MRVČIĆ *et al.*, 2007) e *Candida utilis* (GÖNEN; AKSU, 2008).

2.7.1 Melaço de cana

Melaços de várias origens são utilizados para a produção de etanol, sendo que os mais utilizados são os de beterraba, de milho e de cana.

A cultura de cana-de-açúcar é uma atividade agrícola de grande importância para o Brasil. A produção anual brasileira será de aproximadamente em 500 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2010, aonde é responsável por 25% da produção mundial, com lucros de mais de 20 bilhões de reais ao ano e empregando diretamente mais de 3,6 milhões de trabalhadores em mais de 300 indústrias (FLORENTINO *et al.*, 2008).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009) a produção anual do melaço de cana nacional é de aproximadamente 27 milhões/toneladas. As previsões realizadas até 2018/19 são de que a área de cana deve crescer de 6,0 milhões de hectares. No total das lavouras analisadas, o Brasil deverá ter um acréscimo de área da ordem de 15,5 milhões de hectares nos próximos anos.

Segundo Mian (2010) as usinas do Centro-Sul haviam processado 512,94 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, volume 4,57% superior que o mesmo período do ano passado. Todavia, as quedas no ATR (açúcares totais recuperáveis) também são recordes, atingindo os menores patamares das últimas 10 safras. A média até a primeira quinzena de dezembro foi de 131,25 quilos de ATR por tonelada de cana, 9,83 quilos a menos que o registrado na safra passada. As perdas de ATR e, por conseguinte, de açúcar e etanol, são decorrentes do longo período de chuvas que persiste até os dias de hoje, o que faz com que a cana continue vegetando, e com isso, reduzindo drasticamente seu teor de açúcar.

Os principais componentes do melaço são a água e os carboidratos, além de compostos não-açúcares de origem orgânica como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. O melaço de cana-de-açúcar é constituído por uma fração de origem mineral de grande importância, na qual estão presentes mais de 20 metais e não-metais em diferentes proporções. Entre os cátions

encontrados, o potássio, o cálcio e o magnésio ocupam mais que 98% do total. Do nitrogênio presente no melaço somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucleicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melaço é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspártico e glutâmico, que constituem mais de 70% do total (ICIDCA, 1999).

A contribuição dos fatores de inibição provenientes da cana-de-açúcar pode ser atribuída à própria variedade utilizada, assim como a deterioração dessa planta, ocorrida devido às operações envolvidas no processo de colheita. O ataque de pragas sofridas ainda no campo antes da colheita também tem forte influência na qualidade do caldo de cana-de-açúcar. O mel final, por sua vez, agrega além de todos esses fatores, os provenientes das operações envolvidas na produção do açúcar (CRUIKSHANK; PERRIN, 1964; FRIEND, 1979; GODSHALL; LEGENDRE, 1988).

Entre os compostos que merecem especial destaque, como inibidores das leveduras dos processos de fermentação alcoólica, estão incluídos, além dos ácidos orgânicos e os compostos fenólicos. Existem na literatura, vários trabalhos que descrevem efeitos danosos de compostos fenólicos sobre uma população microbiana, estando incluídas no grupo suscetível as células de levedura (BORZANI; FALCONE, 1960; O'CONNOR; RUBINO, 1991). Alguns destes compostos estão presentes no caldo da cana como descrito por Leite (2000). Dentre os compostos citados estão: ácido gálico, ácido salicílico, ácido caféico, ácido ferulico, ácido sinápico, ácido vanílico entre outros.

2.7.2 Melaço de soja

Tão importante quanto à cana-de-açúcar é a produção de soja. Cerca de 75% da soja produzida no país é exportada (principalmente para a China e União Européia). Em 2004, a exportação de soja rendeu ao país mais de 10 bilhões de dólares (10% da receita total de exportação brasileira) (SMALING *et al.*, 2008).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009) a produção de soja anual é de mais de 58.038 milhões de toneladas e o consumo doméstico de soja em grão deverá atingir 44,4 milhões de toneladas representando 55,0% da produção. O consumo deverá crescer a uma taxa anual de 2,11%, taxa esta praticamente

idêntica ao crescimento previsto mundialmente. Como se sabe, a soja é um componente essencial na fabricação de rações animais e adquire importância crescente na alimentação humana. As projeções de expansão de área plantada de soja mostram que a área deve passar para 26,5 milhões de hectares em 2018/19. Representa um acréscimo de 5,0 milhões de hectares em relação à safra 2007/08. Essa expansão é superada apenas pela expansão prevista da área de cana de açúcar de 7 milhões de hectares. Mas o aumento da produtividade será o principal fator de aumento da produção de soja no Brasil. Enquanto o aumento de produção previsto é de 2,43% ao ano, nos próximos anos a expansão da área é de 1,95%. A soja deve expandir-se através de uma combinação de expansão de fronteira em regiões onde ainda há terras disponíveis e um processo de substituição de lavouras onde não há terras disponíveis para serem incorporadas.

Os principais constituintes do melaço de soja - os açúcares da soja – consistem em cerca de 65% de mono e dissacarídeos e cerca de 35% de oligossacarídeos, principalmente, a rafinose (5-7%) e estaquiase (30-32%). O melaço da soja é um material de baixo custo, que gera problemas ambientais de acúmulo de resíduos, e assim é utilizado principalmente como um ingrediente de baixo custo de nutrição animal. É obtido como um subproduto do processo de fabricação do concentrado protéico de soja, e provém do produto do extrato aquo-alcóolico obtido após a remoção do álcool e parte da água presente (CEGLA; SHUSTER, 2005).

A fermentação alcoólica do melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* converte 50% do total de açúcares em etanol. Entre eles estão a sacarose, a glicose e a frutose. Os açúcares residuais são oligômeros com ligação α -1,6, que podem ser hidrolisados pela enzima α -galactosidase (SANADA *et al.*, 2009).

Atualmente, aproximadamente 260 m³ por dia de vinhaça (resíduo industrial derivado do melaço) são gerados para uma produção de 10 m³ de etanol por dia em uma indústria brasileira processadora de grãos de soja (SIQUEIRA, 2006).

2.8 UTILIZAÇÃO DE MINERAIS EM RAÇÃO ANIMAL

Muitos testes são realizados com a utilização de novos ingredientes capazes de suprir todas as carências e necessidades nutricionais exigidas para alimentação animal,

uma vez que a utilização de produtos como cereais, encarece as mesmas. É com essa abordagem que as indústrias buscam novas alternativas nutricionais, e uma delas é a adição de biomassa de leveduras.

A especificação de levedura seca para a ração animal possui os seguintes requisitos qualidade: umidade máxima (8,0%), proteína bruta mínima (35 a 40%), cor (consistente-clara), pH (maior que 5,0), sabor (característico – acidez), cheiro (característico). Além disso, deve ser isenta de aflatoxinas e carunchos, granulometria de 30 mesh, e ser embalada em polietileno com duas camadas de papel Kraft (LEIMER, 2005).

Uma abordagem a ser discutida é o uso da biomassa de microorganismos enriquecidas com mineirais é importante para atender as mais diversas áreas, como alimento humano e animal, cosmético, farmacêutico, entre outras (MANZONI *et al.*, 2010).

Um dos grandes benefícios dos minerais orgânicos está relacionado à sua maior biodisponibilidade. A biodisponibilidade do mineral, ou seja, a fração do mineral que realmente é absorvida e utilizada pelo animal, varia de acordo com o tipo da fonte mineral e também entre as diferentes espécies animais.

O fato dos minerais orgânicos não interagirem com outros minerais e sofrerem menor influência dentro do trato digestivo, os coloca em vantagem frente às fontes de minerais convencionais, na forma de sais inorgânicos. Ligados a uma molécula orgânica, normalmente aminoácidos ou peptídeos, os minerais orgânicos usam as vias de absorção dessas moléculas. Isto faz com que eles não tenham problemas de interações com outros minerais (MCDOWELL, 1992).

Nos mamíferos, a absorção de zinco ocorre em uma pequena porção do intestino através de dois mecanismos: transporte ativo e passivo. O transporte ativo é saturável em altas concentrações do metal no lúmen do intestino, e sua eficiência aumenta durante períodos de baixa digestão. Ao contrário, o transporte passivo é um mecanismo de difusão, o qual é inalterável durante o período de baixa digestão e sua eficiência é proporcional à concentração de zinco no lúmen. Existem muitos fatores que podem modificar a absorção de zinco, e eles podem ser considerados como ativadores (ácidos picolínico, vitamina B6, citrato, aminoácidos) ou inibidores (ácido oxálico e fítico, fibras, selênio, ferro, cálcio) deste processo (MCDOWELL, 1992).

Mcdowell (1992) afirma que, na forma orgânica, o zinco está protegido do ácido clorídrico liberado no estômago, e passa para o duodeno, onde é facilmente absorvido

pelas células da mucosa, carregadas negativamente. Os receptores de absorção de aminoácidos encontram-se nas microvilosidades intestinais. Esses receptores são células altamente capazes de absorver aminoácidos e estão largamente distribuídos através das paredes da mucosa duodenal. Os aminoácidos ou complexos são absorvidos quase que prontamente. A forma orgânica aumenta a absorção global destes nutrientes vitais na corrente sanguínea, tornando-os altamente biodisponíveis às necessidades orgânicas e funcionais.

Spears (1989) relatou que não encontrou nenhuma diferença ao crescimento de novilhos recebendo óxido de zinco e o quelato de zinco com metionina, embora houvesse a tendência a uma melhor resposta nesse último tratamento. Entretanto em outro estudo, Spears *et al.*, (1991) perceberam que o peso corporal de bezerros desmamados foi mais alto para os bezerros suplementados com zinco metionina do que bezerros controle e os que recebiam óxido de zinco.

Kessler *et al.*, (2003) demonstraram em um estudo com vacas em crescimento que com a suplementação de zinco metionina, o desenvolvimento dos animais melhorou consideravelmente, quando comparados com os tratamentos realizados com óxido de zinco. As melhoras percebidas nos animais destacam o ganho de peso e a razão de conversão da alimentação nos primeiros 56 dias do teste. Assim também, novilhos – em crescimento e em período final de crescimento – suplementados com proteinato de zinco, quando comparados com a suplementação com óxido de zinco, tenderam a crescer mais rapidamente e a ingerir mais ração.

A adição do zinco orgânico em dietas de bovinos aumentou o crescimento (SPEARS, 1989), melhorou as características da carcaça (SPEARS; KEGLEY, 2002) e as medidas da qualidade de cascos (KESSLER *et al.*, 2003), quando comparada com dados observados em animais tratados com uma dieta suplementada com zinco inorgânico.

Também foi observada uma maior absorção de zinco ligado a metionina, quando comparada com a absorção de zinco inorgânico, cerca de três vezes maior, na alimentação de peixes (PARIPATANANONT; LOVELL, 1995).

O cobre pode ser utilizado como promotor de crescimento em aves; seu requerimento nutricional é de 8 mg/kg (NRC, 1994). Como suplemento alimentar, é adicionado em doses maiores (100 a 300 mg/kg. Utilizando suplementação de cobre (125 mg de citrato cúprico e 63 mg de óxido de cobre) em rações para frangos criados em dois períodos (1 a 42 dias e 1 a 56 dias), Pettit *et al.* (1998) observaram melhor desempenho

dos frangos alimentados com 125 mg de citrato cúprico no período de 1 a 42 dias de idade.

Bakalli *et al.* (1995) observaram que o percentual um pouco acima concentrações de cobre aceitável, como sulfato de cobre pentahidratado, em dietas para frangos reduziram a concentração da enzima glutatona hepática e a atividade da HMG-CoA redutase, diminuindo a síntese de colesterol tecidual. A redução de colesterol no sangue (20%) e na gema de ovos (14%) (SKRIVAN *et al.*, 2000).

2.9 DETERMINAÇÕES DE ZINCO E COBRE

A determinação do zinco e cobre é realizada em equipamento de espectrofotometria de absorção atômica, Modelo Spectraa 100-200 AA Varian, sob as seguintes condições analíticas: corrente de lâmpada 9 mA; combustível acetileno; suporte de ar; estequiometria da chama oxidante; comprimento de onda de 213,9 nm; fenda de 1,0 nm de acordo com Roepecke (2007). Para o cobre, a leitura deve ser realizada sob as seguintes condições analíticas: corrente de lâmpada de 4 mA; combustível de acetileno; suporte de ar; estequiometria da chama oxidante; comprimento de onda de 324,7 nm; fenda de 0,5 nm (EATON *et al.*, 1995).

Nas medidas de absorção atômica a melhor precisão é alcançada quando a absorbância se situa na faixa de 0,15 a 1,00 (cerca de 70 a 10% da transmitância). Para isso as concentrações devem ser constantemente ajustadas. As medidas de absorção atômica são influenciadas por certas variáveis analíticas tais como: o fluxo dos gases combustível e oxidante e a velocidade da introdução da amostra na chama. Uma velocidade baixa induz uma população atômica reduzida, enquanto uma velocidade elevada implica num uso excessivo de energia da chama no processo de evaporação, que prejudica a formação de átomos isolados. A espectrofotometria está sujeita a interferências químicas, de ionização e de matriz (EWING, 1989).

A espectrofotometria (Figura 4) permite determinar em torno de 65 elementos na faixa de 1 a 10 ppm com precisão de +/-1% no mínimo.



FIGURA 4 - ESPECTROFOTÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB-I) da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

As etapas do desenvolvimento experimental estão apresentadas na Figura 5.

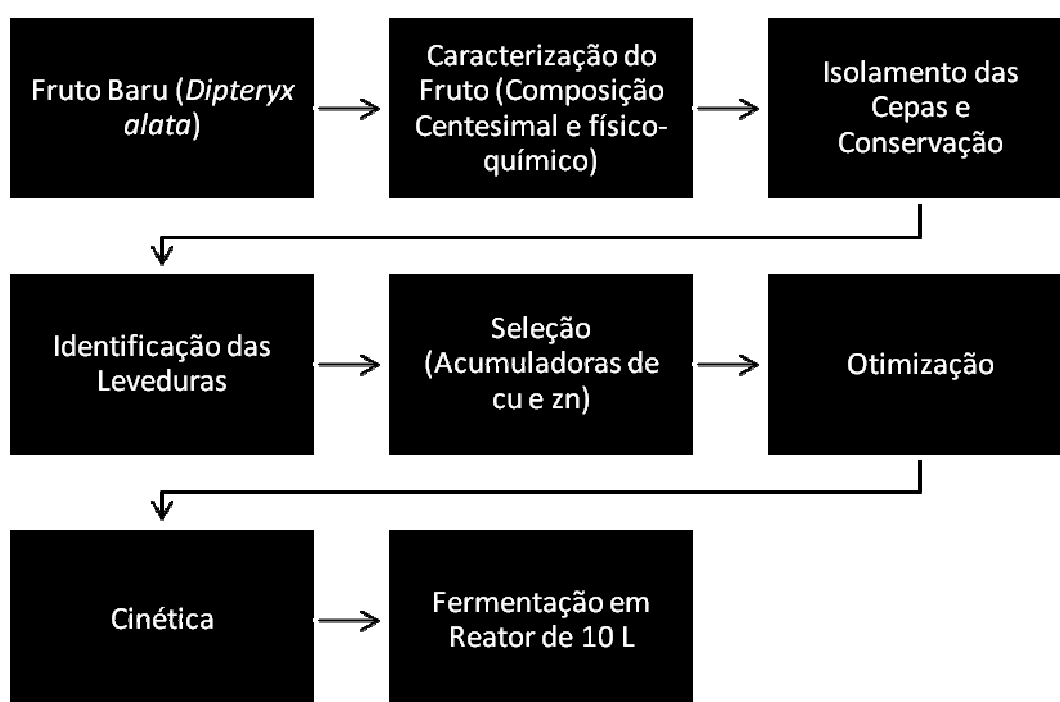


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DESENVOLVIDO DO PROCESSO

3.1 MATÉRIA-PRIMA: FONTE DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

3.1.1 Coleta de amostras para o isolamento de cepas de leveduras

Os frutos maduros de baru (*Dipteryx alata*) foram trazidos das redondezas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Figura 6). Os frutos foram acondicionados em sacos plásticos e colocados em um isopor contendo gelo, e após 48 horas foram iniciadas os primeiros experimentos de caracterização físico-química (3.1.2) e isolamento de leveduras (3.2).

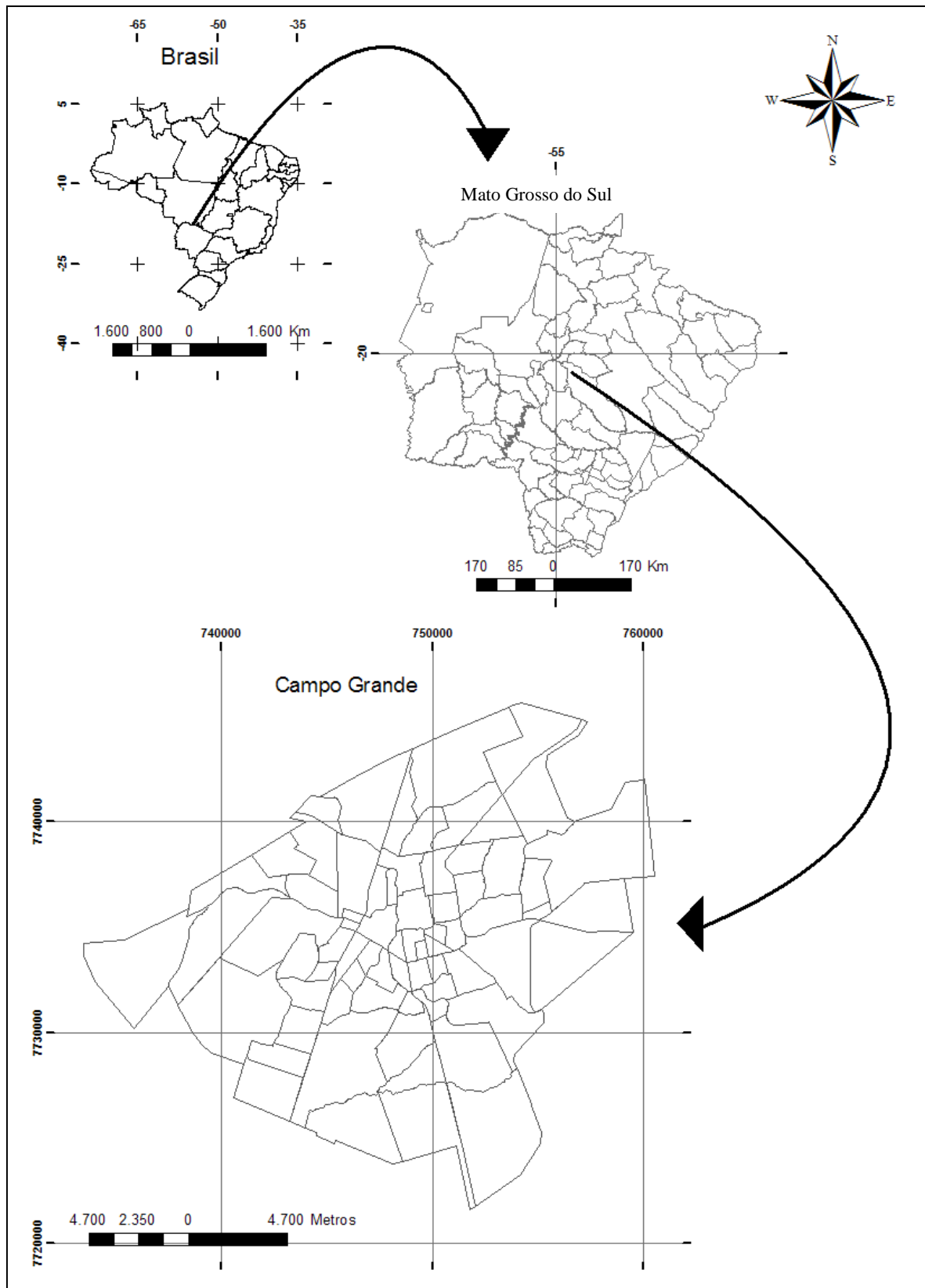


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DE CAMPO GRANDE-MS ONDE OS FRUTOS DE BARU FORAM COLHIDOS

3.1.2 Caracterização físico-química da polpa de baru

A Figura 7 apresenta o fruto Baru (*Dipteryx alata*). A polpa verde e madura foi caracterizada físico-quimicamente conforme as seguintes metodologias.



FIGURA 7 - O FRUTO BARU (*Dipteryx alata* Vogel)
FONTE: O AUTOR (2010)

pH

O pH da suspensão obtida após a homogeneização de 5 g da amostra diluída em 50 mL de água destilada é medido utilizando o método potenciométrico (SOCCOL, 1994).

Atividade água

A atividade de água foi medida em aparelho Aqua-lab CX-2 (YAMAGUISHI, 2008).

Análise termoanalítica

A análise termoanalítica foi aplicada conforme o método e técnica de Carvalho Filho (2000) e Lacerda (2006). O equipamento utilizado foi um TG 60 SHIMADZU (JAPAN). A massa utilizada da polpa foi de 7,0 mg, atmosfera de ar sintético, razão de aquecimento de 10 °C/min e faixa de aquecimento de 30 a 600 °C. A polpa de baru foi previamente ralada e macerada para que houvesse homogeneidade de material particulado.

Proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada conforme IAL (1985) por fração protéica determinada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

Lipídios

A quantificação de lipídios foi realizada conforme IAL (1985) por gravimetria após extração com acetato de etila, refluxado por duas horas em extrator Soxhlet.

Resíduo mineral fixo (Cinzas)

A quantificação de resíduo mineral fixo foi realizada conforme IAL (1985) por método termogravimétrico, após calcinação do material em mufla a 660°C por 24 horas.

Umidade

A quantificação de umidade foi realizada por método termogravimétrico, usando estufa a 105 °C por 24 horas (IAL, 1985).

Fibra bruta

A quantificação da fibra bruta foi realizada por método gravimétrico conforme IAL (1985).

Carboidratos

Os carboidratos foram calculados por diferença, subtraindo-se de 100 a soma das porcentagens de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibras brutas (FREITAS *et al.*, 1979).

3.2 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DO BARU

Após coleta, os frutos foram homogeneizados de maneira aleatória e pesados 25 g da polpa que foi macerada em placa de *Petri* estéril. Em seguida, foi colocado o produto obtido em um frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Com isso, foram acrescentados 225 mL de solução salina 0,85% (NaCl). O conteúdo foi homogeneizado e realizou-se uma diluição seriada, em fator de diluição variando até 10^{-10} , sendo depositados 100 μ l das amostras obtidas em cada diluição, em placas de *Petri* contendo meio de cultura YPD (duplicatas) espalhando-se com alça de *Drigalski* sobre a superfície para a semeadura (ROMEIRO, 2001). As placas semeadas foram incubadas em estufa de crescimento a 28 °C durante 24 horas (em duplicatas).



FIGURA 8 - POLPA DO BARU
FONTE: www.centraldocerrado.org.br

As cepas isoladas foram transferidas para tubos de ensaio e placas (FIGURA 9) contendo meio de cultura YPD (1% de extrato de levedura, 1% de peptona bacteriológica e 3% de dextrose), coletando-se preferencialmente colônias morfologicamente distintas (DÖNMEZ; AKSU, 2001).

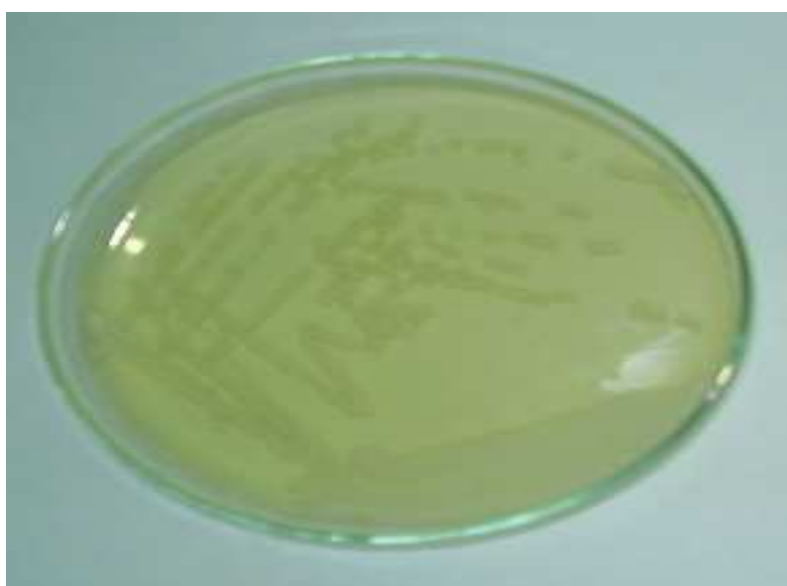


FIGURA 9 - COLÔNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU
FONTE: O AUTOR (2010)

3.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas isoladas e do banco de cepas do laboratório são conservadas em tubos contendo meio de cultivo (YPD), no qual o microrganismo é repicado a cada três meses. Estão sendo mantidas a temperatura de 4 °C. As cepas também foram congeladas a -80 °C e -20 °C com glicerol (10%).

3.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS

Foi utilizado o sistema API 20C AUX da marca BioMérieux (FIGURA 10), onde uma porção do crescimento de cada colônia isolada em meio ágar extrato de levedura (1%), peptona (1%) e dextrose (3%) (YPD) e cultivo de 24-48 horas foi assepticamente transferida para tubos contendo 1mL de solução fisiológica esterilizada e ajustado a uma turbidez equivalente à escala 2 de McFarland.

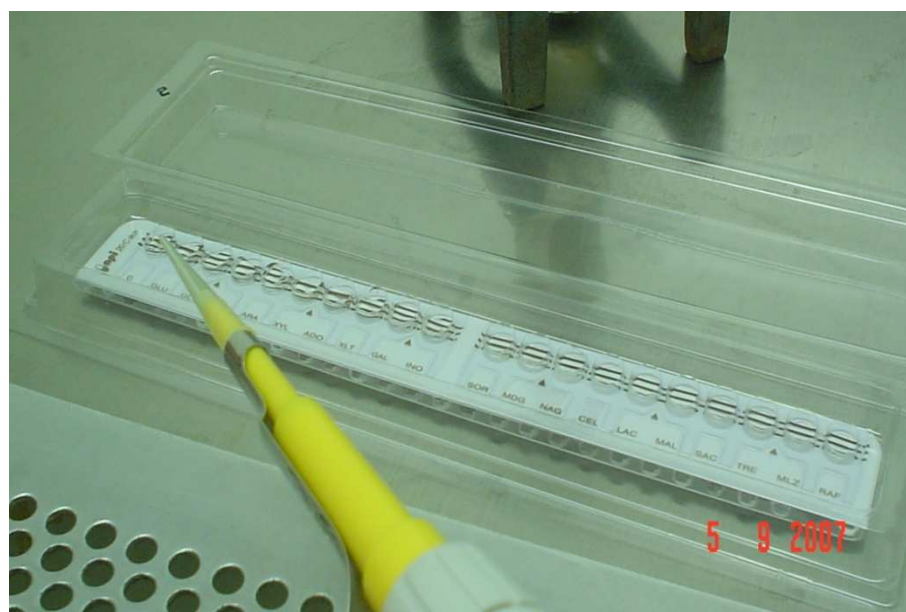


FIGURA 10 - O SISTEMA API20C AUX DA MARCA BIOMÉRIEUX
FONTE: O AUTOR (2007)

Uma gota desta suspensão foi adicionada ao meio basal do API20C AUX e homogeneizado preenchendo, posteriormente, cada poço do painel de identificação.

O painel foi incubado em câmara úmida, previamente preparada, a 30 °C, por até 72 horas, com leituras de 24, 48 e 72 horas. Foi considerado como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de opacidade nos poços de cada carboidrato.

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA CEPA SELECIONADA

3.5.1 Extração de DNA

Biomassa de levedura liofilizada foi transferido para um tubo do tipo eppendorf de 2 ml contendo 300 µL CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) tampão [CTAB 2% (w/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 ; EDTA 20 mM, b-mercaptoetanol 0,2% (v/v)] e cerca de 80 mg de uma mistura de sílica (sílica gel H, 7736 Merck, Darmstadt, Alemanha/Kieselguhr Celite 545, Machery, Düren, Alemanha, 2:1, w/w). As células foram rompidas manualmente num vidro relógio, com bastão de vidro estéril, por aproximadamente 5 min. Posteriormente, 200 µL de tampão CTAB foi adicionado, a mistura foi agitada no vórtice e incubada por 10 min a 65 °C. Após a adição de 500 µL de solução de clorofórmio, a mesma foi misturada e centrifugada por 5 min a 20.500 g, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 2 volumes de gelo de 96% de etanol frio. O DNA foi precipitada durante 30 min a -20 °C e, em seguida, centrifugado novamente por 5 min a 20.500 g. Posteriormente, o sedimento foi lavado com etanol 70 % frio. Após a secagem a temperatura ambiente o material foi ressuspenso em 97,5 µL TE-tampão acrescido de 2,5 mL de RNase 20 U.mL⁻¹ e incubadas por 5 min a 37 °C, antes do armazenamento a -20 °C (GERRIT; HOOG, 1999).

Foi realizada a identificação morfológica através do método descrito por Kern e Blevins (1999), permitindo a análise de estruturas reprodutivas das leveduras por microscopia óptica.

3.5.2 Sequenciamento

O rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) foi amplificado (PCR) usando primers V9G e LS266 (GERRIT; HOOG, 1999) e seqüenciado com ITS5 e ITS4 (WHITE *et al.* 1990). Amplicons foram limpos com kit de purificação GFX PCR DNA (GE Healthcare, UK). O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). As seqüências foram editadas e alinhadas usando o pacote Staden análise da seqüência v1.6.0. A análise da seqüência foi realizada utilizando o software de alinhamento da seqüência blastn executar contra o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>])

3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS

A contagem de células totais foi realizada na câmara de *Neubauer*. As amostras para essa contagem foram diluídas (10%) em água peptonada (Peptona Bacteriológica) e os tubos de diluições agitados no vórtex para tubos. Azul de metileno 0,01% e citrato de sódio 2% foi utilizado para a contagem das células viáveis (ROEPECKE, 2007).

3.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As cepas foram cultivadas em placas de *Petri* contendo meio YPD sólido (15 g/L de Ágar e 1000 mL de H₂O deionizado), as leveduras foram transferidas para um *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 20 mL do meio YPD líquido. O frasco foi incubado sob agitação em incubador do tipo *Shaker* a 30 °C e 120 rpm durante 24 horas, ou até obter-se uma concentração de células da ordem de 1×10^7 a 1×10^8 células/mL.

3.8 SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os experimentos iniciais de produção da biomassa de levedura enriquecida com os diferentes micronutrientes, zinco e cobre, foram realizados em escala laboratorial, em frascos de *Erlenmeyer* de 250 mL, em *Shaker* (FIGURA 11).



FIGURA 11 - SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM *SHAKER*
FONTE: O AUTOR (2010)

Foram testadas neste experimento 11 leveduras isoladas do fruto baru e a cepa *Pichia guilliermondii* NRRLY27063 (ROEPCKE, 2007). As condições foram: melaço de soja e/ou de cana a 5°Brix; extrato de levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. A composição em sais foi baseada no trabalho de Stehlik-Thomas *et al.* (2004). A quantidade de inóculo foi de 10% referente ao volume total (100 mL). As condições físicas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas;

em agitador do tipo *Shaker*. A determinação do bioacúmulo dos micronutrientes e peso seco foi realizada após 120 h de cultivo.

3.9 CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE

Após a escolha da melhor cepa acumuladora do zinco e do cobre realizou-se o estudo da cinética, onde o meio de cultivo utilizado foi o melaço de cana a 5°Brix; extrato de levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L). Tal procedimento foi realizado para a determinação do melhor tempo de bioacúmulo: 24, 48, 72, 96 ou 120 horas, utilizando as mesmas condições físicas: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação e 120 rpm. A determinação do acúmulo dos micronutrientes foi realizada após 120 h de cultivo, porém os pesos secos foram determinados em 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Ao meio de cultura foram adicionadas soluções concentradas de cobre e de zinco (0,1 g/L). As mesmas foram esterilizadas separadamente, para evitar que os metais se agreguem com alguma substância do meio (resíduo industrial).

3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES DO PROCESSO

Foi utilizada a metodologia do planejamento experimental com o emprego de planejamentos experimentais do tipo fatoriais fracionados e completos.

Delineamentos fatoriais fracionados podem ser utilizados para seleção e determinação de componentes do meio (ROEPCKE, 2007), ou variáveis fermentativas (pH, temperatura e agitação), os quais podem ter um efeito significativo e podem ser otimizados.

As análises dos resultados, produção de biomassa e rendimento de acúmulo (%) foram realizadas com o suporte do software STATISTICA 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Todos os ensaios foram realizados em frascos de *Erlenmeyer* de 250 mL em duplicata.

3.10.1 Otimização das variáveis físicas do processo de bioacúmulo de zinco e cobre

A otimização dos fatores físico-químicas (pH, temperatura e taxa de inóculo) nos processos de bioacúmulo de zinco e cobre foi realizada através de planejamentos experimentais do tipo fatorial 2^3 completo (Tabelas 2 e 3), usando como substrato melaço de cana a 5° Brix enriquecido com 0,1 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Os experimentos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* 250 mL, em shaker a 120 rpm por 72 horas. A interpretação dos resultados obtidos foi realizada através do programa STATISTICA7.

TABELA 2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 – VARIÁVEIS E NÍVEIS

Nível	pH	Temperatura (°C)	Taxa de Inóculo (%)
-1	4	25	5
0	5	30	7,5
+1	6	35	10

TABELA 3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 – FATORES FÍSICO-QUÍMICOS

Experimento	pH	Temperatura	Taxa de Inóculo
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Após a determinação dos melhores fatores físicos, foram testados os fatores químicos que influenciam o bioacúmulo de zinco e cobre pela cepa selecionada.

3.10.2 Otimização das variáveis químicas do processo de bioacúmulo de zinco e cobre

A primeira etapa de otimização dos fatores químicos ocorreu com a seleção da melhor fonte de nitrogênio (uréia, NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), em concentração equivalente ao teor de nitrogênio de 1 g/L de uréia.

Para o estudo da influência dos fatores químicos ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ sobre o processo de produção de biomassa (g/L) e rendimento (%) do bioacúmulo dos microelementos, o planejamento experimental *Plackett Burman* de modo a testar a ausência e presença de cada elemento, foi empregado. Foram testados 7 componentes em 3 níveis diferentes de concentração (g/L) conforme as Tabelas 4 e 5. As análises dos resultados foram conduzidas com o suporte do programa STATISTICA7.

TABELA 4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES E NÍVEIS

Nível	Sulfato Amônio	Uréia	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
-1	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0.5	1	1.25	0.065	0.25	0.05
+1	2	1	2	2.5	0.13	0.5	0.1

TABELA 5 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS

Experimento	Sulfato Amônio	Uréia	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0

Em seguida, utilizou-se um planejamento experimental fatorial incompleto 2^{4-1} para mais uma seleção de variáveis significativas. Dentre as 4 variáveis estudadas para o cobre e para o zinco, respectivamente (Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10): cobre ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, CaCl_2 , °BRIX) e zinco (uréia, CaCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, °BRIX). Todo o experimento foi realizado através do programa STATISTICA7.

TABELA 6 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2^{4-1} – FATORES E NÍVEIS – COBRE

Nível	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, g/L	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, g/L	CaCl_2 , g/L	°BRIX
-1	2	2	0,13	5
0	3	3	0,26	7,5
+1	4	4	0,52	10

TABELA 7 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – COBRE

Experimento	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	CaCl_2	°BRIX
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	1
4	-1	1	1	-1
5	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	1	-1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

TABELA 8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2^{4-1} – FATORES E NÍVEIS – ZINCO

Nível	Uréia, g/L	CaCl_2 , g/L	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, g/L	°BRIX
-1	2	2	0,13	5
0	3	3	0,26	7,5
+1	4	4	0,52	10

TABELA 9 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL INCOMPLETO 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – ZINCO

Experimento	Uréia	CaCl ₂	Fe ₂ (SO ₄) ₃	°BRIX
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	1
4	-1	1	1	-1
5	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	1	-1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Após a realização desse experimento acima, foi testado com o melhor resultado da Tabela 7 para determinar as melhores condições para o aumento do rendimento (%) e da biomassa (g/L). O CaCl₂ mostrou-se significativo para a produção de biomassa rica em cobre e zinco. Por isso foi testado separadamente para se verificar se havia significância ou não seu uso.

TABELA 10 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA COBRE – VARIÁVEIS E NÍVEIS

Nível	(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L	BRIX
-1,41421	0,59	3,96
-1	1	5
0	2	7,5
1	3	10
1,41421	3,41	11,03

TABELA 11 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA COBRE - EXPERIMENTOS

Experimento	(NH ₄) ₂ SO ₄	BRIX
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41421	0
6	1,41421	0
7	0	-1,41421
8	0	1,41421
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Nas Tabelas 10 a 13, são demonstrados a terceira etapa de otimização do experimento com a aplicação de um planejamento experimental composto central, tanto para o cobre (Tabelas 10 e 11), como para o zinco (Tabelas 12 e 13).

TABELA 12 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA ZINCO – VARIÁVEIS E NÍVEIS

Nível	Uréia, g/L	BRIX
-1,41421	0,59	3,96
-1	1	5
0	2	7,5
1	3	10
1,41421	3,41	11,03

TABELA 13 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL DO TIPO COMPOSTO CENTRAL PARA ZINCO - EXPERIMENTOS

Experimento	Uréia	BRIX
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41421	0
6	1,41421	0
7	0	-1,41421
8	0	1,41421
9	0	0
10	0	0
11	0	0

3.10.3 Validação da otimização dos fatores físico-químicos do processo

Com a finalidade de comprovar a efetividade da otimização dos parâmetros físico-químicos do processo, realizou-se, em duplicata, nova fermentação nas condições otimizadas pelos experimentos descritos anteriormente, cuja produção de biomassa e rendimento de bioacúmulo (μ_0) foram comparados através de teste estatístico de hipótese ($H_0: \mu_0 = \mu_1$) com resultados teóricos obtidos através de modelos matemáticos obtidos ao final da otimização (μ_1) (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

3.11 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA BIOMASSA RICA EM ZINCO E COBRE

Com as condições físico-químicas otimizadas, utilizando a *Candida pelliculosa* (BARU05), foi estudada a evolução das variáveis do processo de produção de biomassa bem como do acúmulo de micronutrientes (zinco e cobre) separadamente. As condições utilizadas foram as definidas nos itens anteriores.

Foram realizadas análises em: 24, 48, 72, 96 e 120 horas para determinar o peso seco (biomassa, g/L) e a concentração dos micronutrientes (zinco e cobre) bioacumuladas nas biomassas.

3.12 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE EM BIORREATOR DE 10 LITROS.

O experimento foi realizado inicialmente com o preparo do pré-inóculo. As condições de fermentação foram estabelecidas conforme as otimizações dos fatores físicos e químicos dos microelementos em questão. Os parâmetros físicos utilizados para o presente experimento foram para o cobre: pH 6, taxa de inóculo: 7,5%, 30 °C e para o zinco: pH 4, taxa de inóculo: 5%, 28 °C. A agitação variou de acordo com o oxigênio dissolvido que era de 30%. O melaço de cana foi suplementado para o aumento do bioacúmulo e biomassa com 3 g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e 0,1 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ para o zinco, e com 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ para o cobre.

O biorreator de 10 litros (FIGURA 12) utilizado foi o BioFlo[®] 110 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC COMPANY, USA). O volume útil do meio utilizado foi de 5 litros para a bioacumulação do microelementos de interesse (cobre e zinco).



FIGURA 12 - BIORREATOR DE 10 LITROS
FONTE: O AUTOR (2010)

Os experimentos foram realizados em duplicata. Com o interesse de se acompanhar uma cinética microbiana, uma amostra foi retirada de 12 em 12 horas, com intuito de acompanhar o desenvolvimento de biomassa e a bioacumulação dos metais pesados em até 72 horas de fermentação (tempo máximo de consumo dos açúcares totais e redutores e do crescimento da biomassa). O meio foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos (ROEPECKE, 2007).

3.12.1 Fermentação em batelada

O meio empregado na fermentação foi o melaço de cana a 10 °Brix (sólidos solúveis). Foram preparados soluções para correção do pH: 3M de NaOH, 10 % de H₃PO₄ e antiespumante de silicone H10. Todos eles foram esterilizados separadamente.

Os parâmetros físicos utilizados para o presente experimento, foram os determinados na otimização física (ver item 3.9.1) para o cobre: pH 6, taxa de inóculo: 7,5%, 30 °C. Para o zinco: pH 4, taxa de inóculo: 5%, 28 °C. A agitação variou de acordo com o oxigênio dissolvido (DO_2) que era de 30%.

O melaço de cana foi suplementado para o aumento do bioacúmulo e biomassa de zinco com 3 g/L de $(NH_2)_2CO$ uréia e 0,1 g/L de $Fe_2(SO_4)_3$. Para o meio cobre foi suplementado com 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 3 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$.

3.12.2 Fermentação em batelada alimentada

Para essa fermentação em batelada alimentada (FIGURA 13) foi utilizado o biorreator de 10 litros BioFlo[®] 110 (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC COMPANY, USA). O volume útil de meio foi de 5 litros para a bioacumulação do microelementos de interesse (cobre e zinco).



FIGURA 13 - BIORREATOR DE 10 LITROS E O FRASCO DE ALIMENTAÇÃO
FONTE: O AUTOR (2010)

Os parâmetros físicos e químicos utilizados foram os mesmos da fermentação em batelada. Contudo, foi adicionado um volume de melaço de cana cuja concentração calculada em brix, quando o meio fosse diluído, ficasse na mesma concentração de açúcares iniciais. O tempo calculado para alimentação no biorreator, de acordo com as análises do consumo de açúcares, no substrato melaço de cana, o melhor tempo de alimentação foi em 20 horas. A partir desse tempo alimentou-se, com melaço de cana, o biorreator uma vez.

3.13 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA PRODUZIDA

Para determinar a massa celular produzida durante a fermentação empregou-se o método direto, que consiste na secagem do material produzido e determinação do peso seco. Primeiramente pesou-se (P_1) placas de Petri ou tubos de centrífuga previamente tarados, numa balança analítica. O material fermentado é centrifugado para restar apenas a biomassa precipitada. As placas vão para uma estufa de 60 a 80°C até atingir peso constante. Espera-se esfriar os tubos ou as placas são pesadas novamente (P_2). O valor da biomassa seca é calculado pela diferença ($P_1 - P_2$) sobre o volume de amostra centrifugado e convertido para o volume total em gramas de biomassa seca (ROEPECKE, 2007).

3.14 DETERMINAÇÃO DE ZINCO E COBRE

Os níveis de zinco e cobre contidos no sobrenadante foram determinados (rendimento), e a quantidade de zinco e cobre contido na biomassa foi obtida através de método indireto, subtraindo-se a concentração de zinco e cobre no sobrenadante (C_{sob}) da sua concentração inicial no meio de fermentação (C_0) (DÖNMEZ; AKSU, 1999).

A quantidade de 0,45 mL de amostra (sobrenadante) foram previamente digeridos, através da adição 5 mL de ácido nítrico e 1 mL de peróxido de oxigênio em um balão de digestão de 250 mL (AOAC, 1997).

A amostra foi digerida por cerca de 1 hora sob refluxo em chapa, ou até a ausência de desprendimento de vapores nitrosos amarelos pelo tubo refrigerador e a amostra estar

límpida. Após esta etapa, a solução foi filtrada e feita a aferição do volume para 100 mL com água deionizada em balão volumétrico.

A leitura da concentração de zinco e de cobre da solução foi realizada em um equipamento de espectrometria de absorção atômica, Modelo Spectraa 100-200 AA Varian. A leitura de zinco foi realizada sob as seguintes condições analíticas: corrente de lâmpada, 9 mA; combustível, acetileno; suporte, ar; estequiometria da chama, oxidante; comprimento de onda, 213,9 nm; fenda, 1,0 nm (ROEPECKE, 2007). Para o cobre, a leitura foi realizada sob as seguintes condições analíticas: corrente de lâmpada, 4 mA; combustível, acetileno; suporte, ar; estequiometria da chama, oxidante; comprimento de onda, 324,7 nm; fenda, 0,5 nm (EATON *et al.*, 1995).

3.15 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES

O teor de açúcares redutores e totais e proteínas foram determinados através dos métodos de Fenol-Sulfúrico (Açúcar Total) e Somogyi-Nelson (Açúcar Redutor).

Após a leitura de absorbância no aparelho Power Wave XS da marca BioTec®, os dados foram analisados pelo programa KC Junior. O teste seguiu a metodologia usada por Devienne e Raddi (2002).

3.16 CÁLCULO DO RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE ZINCO E COBRE

O rendimento do processo de bioacúmulo de zinco e cobre ($U_{\%}$) foi determinado através da fórmula

$$U_{\%} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

onde C_0 é a concentração inicial de micronutriente no meio, C é a concentração de micronutriente presente no sobrenadante, e $U_{\%}$ é o rendimento de bioacúmulo do respectivo micronutriente, em porcentagem (MAPOLELO *et al.*, 2005).

3.17 CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO E DE BIOACÚMULO

A velocidade específica de crescimento microbiano (μ_X) e de bioacúmulo de micronutrientes (μ_P) foram calculadas pelas fórmulas abaixo,

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

onde X é a concentração de biomassa, P é a concentração de micronutrientes presente na biomassa, e t é o tempo (DORAN, 1997). Para fins de cálculo foram utilizados dados obtidos no início da fermentação ($t = 0h$) e após o final da fase de crescimento exponencial da biomassa, na qual $\frac{dX}{dt} \approx \frac{\Delta X}{\Delta t}$ e $\frac{dP}{dt} \approx \frac{\Delta P}{\Delta t}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FRUTO BARU

Os resultados da caracterização físico-química da polpa verde e madura do baru são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA POLPA VERDE E MADURA DO BARU

Componentes	Polpa Verde (Valores %)	Polpa Madura (Valores %)
Umidade	24,57 ± 0,28	24,04 ± 0,053
Cinzas	2,16 ± 0,21	1,34 ± 0,024
Lipídios	0,31 ± 0,05	5,77 ± 2,78
Proteínas	4,89 ± 0,009	4,34 ± 0,21
Fibra Bruta	1,54 ± 0,1	1,2 ± 0,53
Carboidratos	66,51 ± 0,37	63,28 ± 3,08

TABELA 15 - pH E ATIVIDADE DE ÁGUA DA POLPA VERDE E MADURA DO BARU

	Polpa Verde	Polpa Madura
pH	6,5	5,9
Atividade de Água	0,95	0,96

Na Tabela 14 observam-se valores semelhantes tanto da polpa verde, quanto da polpa madura de baru. Porém, os teores de lipídios foram de 0,31 % (polpa verde) e 5,77 % (polpa madura), tornando-se mesmo assim uma polpa não calórica. Contudo, na polpa madura, onde foram isolados os microrganismos de interesse industrial, foram obtidos 24,04 % de umidade, 1,34 % de cinzas, 5,77 % de lipídios, 4,34 % de proteínas, 1,2 % de fibras brutas e 63,28 % de carboidratos totais.

Comparando com Togashi (1993) obtive valores próximos aos que se encontra na Tabela 14, para lipídios (3,46 %) e proteínas (5,59 %) na polpa madura. A diferença é justificada por Candil (2004) que afirma que fatores genéticos e do ambiente (regiões de cultivo, solo e clima) têm influência sobre suas propriedades nutricionais.

Togashi (1993) ainda abordou que na polpa encontram-se propriedades antinutricionais, tais como: taninos (3112 mg/100g), ácido fítico (0,27%) e inibidor de tripsina (0,67%).

Na Tabela 15, o pH (5,9 e 6,5) e a atividade e água (0,96 e 0,95) apresentaram uma pequena diferença para polpas madura e verde e similaridades para a atividade de água (polpas madura e verde).

Uma das aplicações do baru seria a utilização de sua microflora para a produção de biomoléculas e/ou obtenção de produtos para suplementos nutricionais. Dentre estes se cita biomassa rica em micronutrientes como zinco e cobre, utilizada como suplemento em ração animal a qual pode ser obtida a partir de processos biotecnológicos. Sua composição é favorável como substrato para processos biotecnológicos, devido à sua alta concentração de carboidratos, baixa concentração de lipídios e pH brando.

Na Figura 14, a análise realizada por TGA (—) observou-se que ocorrem três processos de perda de massa. A curva DTA (----) mostrou uma banda inicial em 70 °C correspondente à eliminação de água.

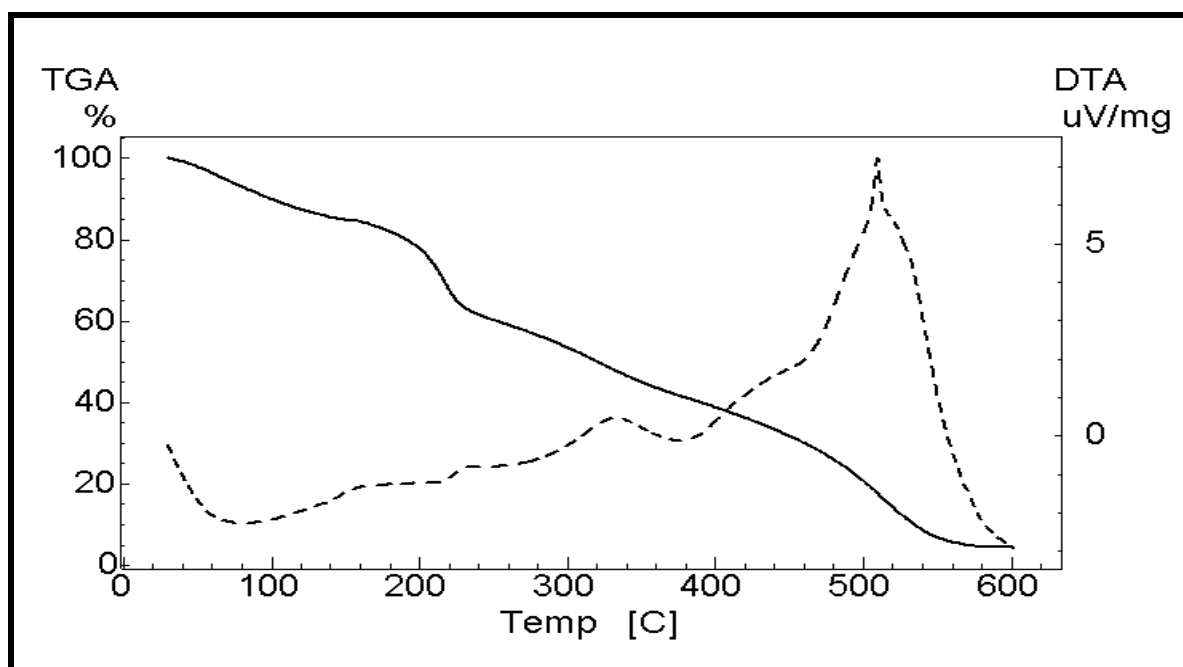


FIGURA 14 - ANÁLISE TGA/DTA DA POLPA MADURA DO BARU

O material analisado possui aproximadamente 17% de umidade, verificado entre 30 e 150 °C. Após a perda de água, sob a presença de oxigênio, houve a perda de massa orgânica

até aproximadamente 250 °C. Nesta região provavelmente ocorreu a perda de material amiláceo. A DTA apresenta um primeiro pico mais evidenciado, assim, caracterizando queima oxidativa.

Lacerda (2006) aborda de maneira diferente aos resultados encontrados acima que a termogravimetria mostrou que os amidos possuem higroscopicidade particulares, ainda, que a sua estabilidade térmica é de aproximadamente 300 °C, diferente da Figura 14, que para a polpa do fruto baru foi de aproximadamente 250 °C.

Por fim, a massa do material restante é perdida e a DTA mostra um pico mais intenso, pois, provavelmente se trata de material fibroso (lignocelulósico).

Candil (2004) aborda que os resultados térmicos obtidos mostram perdas de massa consecutivas das nozes de baru em 5 e 4 etapas respectivamente, sendo que a primeira etapa de perda, ocorre entre a temperatura ambiente e 194,35 °C (BC) e 188, 28 °C (BSC) com perdas de 8,836% e 4,283%, atribuídas à eliminação de água e outros compostos voláteis. Até a finalização desta etapa de desidratação ou perda de água, pode-se sugerir que não há perda apreciável e decomposição de proteínas e óleos graxos. Esta etapa de tratamento térmico é a mais importante nas características de aceitabilidade da noz de cumbaru, pois também está associada à inativação de fatores antinutricionais, de crocância, sabor e aceitabilidade, além do valor comercial da noz de cumbaru. Martins *et al.* (2009) recentemente apresentaram trabalho com a torra e cumbaru despolpado. Estes pesquisadores encontraram após os testes de aceitabilidade a temperatura de 150 °C por 50 minutos como a temperatura de preparação ótima para as amêndoas de cumbaru.

Candil (2004) afirma, que a retirada da casca de noz antes da torra, provoca uma redução no teor de águas prováveis voláteis em torno de 50%. O resultado sugere que a noz descascada deverá ser processada num período mais curto de tempo, com a conseqüência de um menor custo de processamento associado, em virtude de reduzir custos de energia empregada para a torra e minimização do tempo de processamento térmico. Outro fato que merece ser destacado, é que a presente autora aborda que houve em seu trabalho o processamento térmico sem degradação severa do conteúdo protéico. Esta região encontra-se no intervalo de temperatura de 20 °C a 225 °C. A partir de 225 °C a degradação das proteínas é intensa com a destruição acentuada dos aminoácidos constituintes. Em seguida, pode-se observar as perdas relativas ao processo de decomposição térmica plena da castanha até temperaturas em torno de 602,55 e 620,31 °C (BC e BSC) com formação de resíduos da ordem de 3,659 e 4,015% (resíduos de carbozinação), formados por sais minerais e óxidos metálicos.

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA MICROFLORA DO BARU

Foram isoladas 44 cepas (bactérias e fungos filamentosos), dos quais 11 linhagens apresentaram características esféricas de leveduras, no meio de cultura YPD.

A Figura 15 apresenta disperso placas com algumas leveduras isoladas.

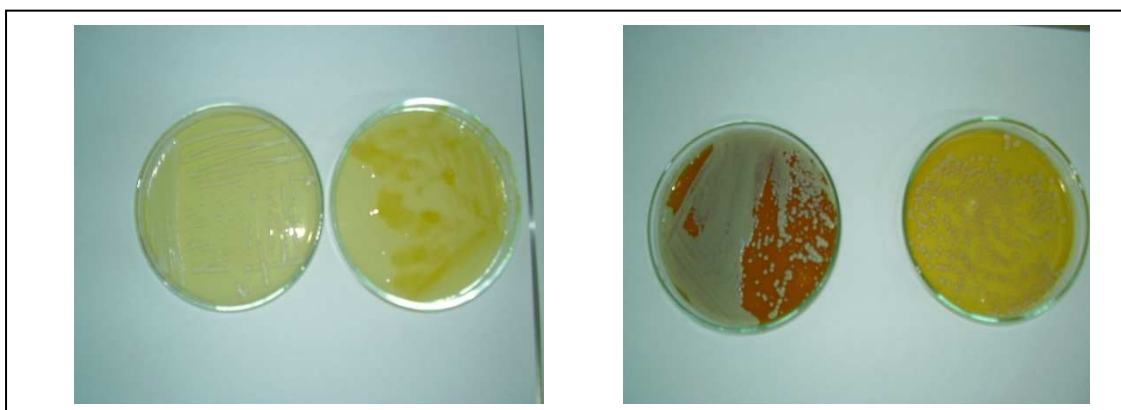


FIGURA 15 - LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO BARU

4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS LEVEDURAS

As cepas isoladas de leveduras foram identificadas bioquímica e molecularmente conforme a descrição no item 3.4.

4.3.1 Identificação bioquímica das cepas de leveduras isoladas da polpa de baru.

Os resultados da identificação bioquímica das cepas de levedura isoladas da polpa do baru estão apresentados na Tabela 16.

As linhagens foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* com mais de 84% de porcentual de confirmação, o que indica uma ótima identificação. Duas cepas (BARU10 e BARU11) foram identificadas como *Candida guilliermondii* com 84,3% de confirmação, o que indica que possam ser da mesma estirpe. Oito cepas foram identificadas

como *Candida pelliculosa* com mais de 96% de confirmação. Uma cepa (BARU05) foi identificada como *Candida lusitaniae* com 97,8% de confirmação.

TABELA 16 - IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU

Cepa	Espécie	Tamanho	Forma	Porcentagem
BARU01	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	97,8
BARU02	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	99,2
BARU03	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	99,8
BARU04	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	99,6
BARU05	<i>Candida lusitaniae</i>	> 2 µm	Oval	97,8
BARU06	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	98,5
BARU07	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	99,4
BARU08	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	96,4
BARU09	<i>Candida pelliculosa</i>	> 2 µm	Oval	96,6
BARU10	<i>Candida guilliermondii</i>	> 2 µm	Oval	84,3
BARU11	<i>Candida guilliermondii</i>	> 2 µm	Oval	84,3

Fernandes (2008) afirma em seu trabalho de isolamento, que das 4 frutas (banana, manga, papaia e uva preta) originaram culturas puras de *C. quercitrusa*, *Pseudozyma antarctica*, *C. parapsilosis* e de *H. uvarum*, respectivamente. Na maçã predominaram as leveduras apiculadas, enquanto no ananás e na uva branca *P. guilliermondii* foi a espécie dominante (> 80%) e no pêssgo a espécie *P. mexicana* foi de maior ocorrência relativa (65%).

4.3.2 Identificação molecular da cepa BARU05.

Os marcadores moleculares permitem a substituição ou confirmação dos marcadores morfológicos e fisiológicos. Através dos marcadores moleculares, pode-se definir todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Desta forma, para uma melhor identificação a amplificação das regiões ITS através de PCR seguida de seqüenciamento da região amplificada e análise de homologia com

seqüências já depositadas em bancos de dados, têm sido utilizada com frequência para a identificação de espécies fúngicas (SARTORI, 2002).

Com relação ao uso de iniciadores no presente trabalho, optou-se por se utilizar o par ITS4 e ITS5 na técnica de seqüenciamento. No experimento foi utilizado com base de identificação o ID ITS *Wickerhamomyces anomalus* isolado da UOA/HCPF 2681 (Figura 16), como a máxima de ID de 100% para a sinonímia de *Candida pelliculosa*.

```

GTGTTTTTTTTTTCTTCTCGCACCCGTTTTCCCGCCACTCCC TTCCC TTTACA
GGACGGATGATTTTTTCAAGGATCTCGCCCCCTCTTTAGTTGATGGTC TATTTTC
CCTTG GCGCGAGCGAAAC TAGA ACTATGTTCTCATA GGG AAG AATCAATAC
CCACACCTGGTTTCTATATTA AACCTAGCGAGAGGCTCCCCCTCTCCCCTCT
CTCCCTCGACAACCCACCCCTCTTGGGGGTCCGGAGGTTTTTCAGTCGTCCCC
CCTCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGG
CTTCCGGATCAGCTTAGAGTAGAGGGCAACTTCCACTCGGGGCAGAGAAGC
TAGTCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTACAAGGTTTC CGT
AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTG
CGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGG
GTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCC AAAGGTCTAAACACATTTTTTTAATGTTA
AAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTA AAATCTTCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCAT
TTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTA
ACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTAATAAGCAGTCTTTC TGAAAT
AATGTATTAGGTTCTTCCA ACTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTA
TTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAAATCAGGT
AGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC
AACAGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTG
AAATCTAGCACCTTCGGTGTTTGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGG
TTTGCTCTTGTTCTATGTTCC TTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAAAT
CCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGTGCTATCGAAGAGTCGAGTT
TG GGGGTGGGGGAGCATCGAA

```

FIGURA 16 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DO DNA DA LEVEDURA BARU05 – *Candida pelliculosa*

Stringare (2009) relata que as seqüências codificantes, como as ITS (*Internal Transcribed Spacer*) são de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações. Porém, Lima (2006) afirma que é uma importante ferramenta, a inserção desses ITS, para o seqüenciamento, pois contribuem em novas identificações de linhagens que podem estar sendo classificadas, taxonomicamente, erradas.

4.4 SELEÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Do trabalho de seleção, as 11 cepas de levedura selecionadas foram testadas em fermentação submersa quanto à sua capacidade de acúmulo de zinco e cobre. Ensaios preliminares demonstram que leveduras são capazes de absorver tais nutrientes, confirmando os resultados de Stehlik-Tomas *et al.* (2004) com 15,4% de rendimento de zinco bioacumulado por *Saccharomyces cerevisiae* e Dönmez e Aksu (1999) com 72,6% de rendimento usando *Candida* sp. para o bioacúmulo de cobre.

4.4.1 Seleção de cepas para produção de biomassa rica em zinco

Os substratos utilizados como meio de produção de biomassa rica em zinco foram o melaço de soja e melaço de cana.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os resultados do teste de seleção de cepas isoladas quanto a produção de biomassa rica em zinco em melaço de soja e de cana, respectivamente.

TABELA 17 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE SOJA – ZINCO – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO *Pichia guilliermondii*

Cepa	Biomassa (g/L)	Bioacúmulo (mg/kg)	Rendimento (%)
BARU01	3,87	1860,47	31,656
BARU02	2,48	1693,55	18,460
BARU03	3,07	2899,02	39,032
BARU04	2,96	3040,54	39,630
BARU05	4,26	4460,09	83,614
BARU06	4,40	2068,18	40,084
BARU07	2,65	1584,91	18,459
BARU08	4,24	2287,74	42,529
BARU09	4,23	1702,13	31,654
BARU10	3,50	2857,14	43,979
BARU11	3,65	1095,89	17,571
<i>Pichia guilliermondii</i>	4,37	1038,663	19,974

TABELA 18 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE CANA – ZINCO – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO *Pichia guilliermondii*

Cepa	Biomassa (g/L)	Bioacúmulo (mg/kg)	Rendimento (%)
BARU01	5,036	1622,32	36,939
BARU02	6,473	1268,35	36,150
BARU03	8,921	560,475	21,997
BARU04	6,533	918,414	26,436
BARU05	9,926	2035,06	88,694
BARU06	7,088	1566,03	48,918
BARU07	7,870	1044,47	36,150
BARU08	6,303	999,524	22,875
BARU09	6,598	1197,33	34,751
BARU10	8,996	1333,93	52,819
BARU11	7,324	682,687	21,997
<i>Pichia guilliermondii</i>	5,014	1798,384	39,670

A cepa BARU05 produziu 4,26 g/L de biomassa em melaço de soja, enquanto em melaço de cana a mesma produziu 9,93 g/L. A mesma cepa acumulou 4460,09 mg/Kg e 2035,06 mg/Kg de zinco em melaço de cana e melaço de soja, respectivamente (Tabelas 17 e 18).

Contudo, nessa mesma abordagem, o rendimento (%) é um ponto primordial para a escolha da melhor linhagem, a BARU05, para ambos os resíduos foi a melhor na seleção (acima de 80 % de rendimento). Porém, cabe ressaltar que o melaço de cana é o melhor substrato (88 % de rendimento).

Roepecke (2007) apresentou que a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, utilizando o melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja a 5 °Brix, acumulou 13.028 e 17.956 mg de zinco/kg de biomassa produzida, respectivamente. A mesma cepa produziu 1798,384 mg/Kg e 1038,663 mg/Kg de biomassa no processo com melaço de cana e melaço de soja, respectivamente.

4.4.2 Seleção de cepas para a produção de biomassa rica em cobre.

Os resultados obtidos para a seleção de cepas que acumularam zinco mostraram que o meio melaço de cana propiciou um melhor acúmulo e produção de biomassa, sendo assim, foi escolhido o meio para produção de biomassa rica em cobre.

Na Tabela 19, observa-se que o melaço de cana propiciou um bom rendimento de acúmulo e produção de biomassa. Dentre todas as cepas, a *Candida pelliculosa* (BARU05) apresentou resultados superiores às demais, com 9,95 g/L de biomassa e 87,86 % de rendimento de acúmulo.

TABELA 19 - SELEÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DA POLPA DO BARU EM MELAÇO DE CANA – COBRE – COMPARANDO COM A CEPA PADRÃO *Pichia guilliermondii*

Cepa	Biomassa (g/L)	Bioacúmulo (mg/kg)	Rendimento (%)
BARU01	6,825	1172,16	31,430
BARU02	6,975	745,52	20,470
BARU03	6,879	1337,4	36,150
BARU04	7,154	559,128	15,720
BARU05	9,948	2251,71	87,860
BARU06	7,354	1033,45	29,690
BARU07	7,360	842,391	24,400
BARU08	8,575	583,09	19,690
BARU09	8,396	940,924	31,044
BARU10	6,777	1475,58	39,375
BARU11	6,735	579,065	15,277
<i>Pichia guilliermondii</i>	6,454	1175,969	29,822

Ainda na Tabela 19, é interessante ressaltar que a produção de biomassa foi melhor no melaço de cana. Porém, observa-se que é necessário melhorar no rendimento de acúmulo (%) do cobre, o qual está ainda na faixa de 88 %.

Para confirmar a importância do melaço de cana, Gallo (1989) aborda que o resíduo apresenta quantidades variáveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água e pH que proporcionam o crescimento de uma grande flora microbiana.

4.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO E COBRE

O objetivo de se acompanhar o crescimento da *Candida pelliculosa* BARU 05 (tempo x biomassa e bioacúmulo) foi de determinar o melhor momento da produção de interesse (biomassa rica em zinco ou cobre).

As Figuras 17 e 18 apresentam a cinética de produção de biomassa pela cepa *Candida pelliculosa* BARU05 e bioacúmulo de zinco e cobre.

Observa-se ainda na Figura 17 que o cobre presente no meio interferiu no crescimento celular, postergando o início da fase de crescimento exponencial e reduzindo a biomassa produzida em 15,07 %. A interferência do cobre sobre o desenvolvimento microbiano, também foi detectado por Dönmez e Aksu (1999).

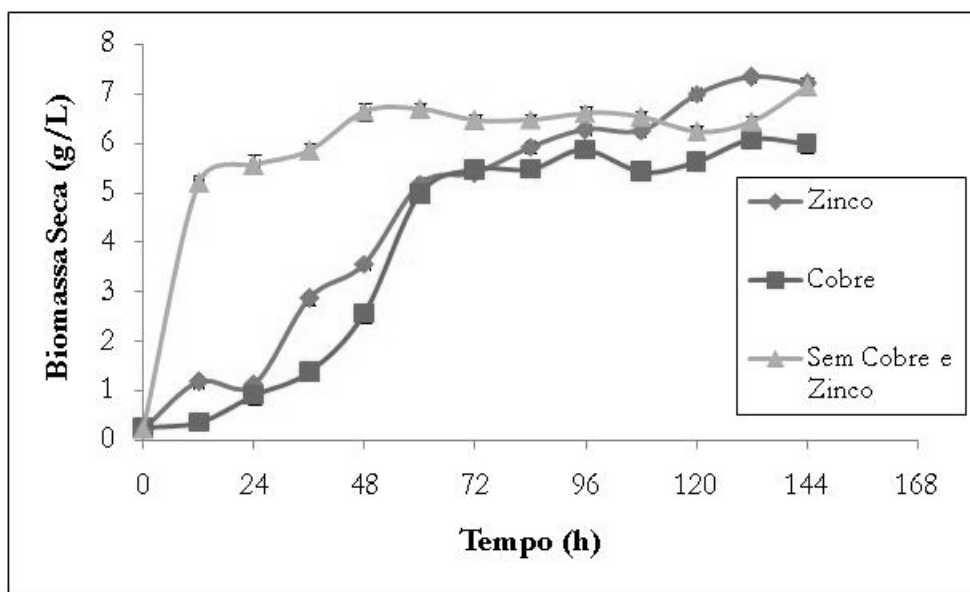


FIGURA 17 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA DE *Candida pelliculosa* DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO

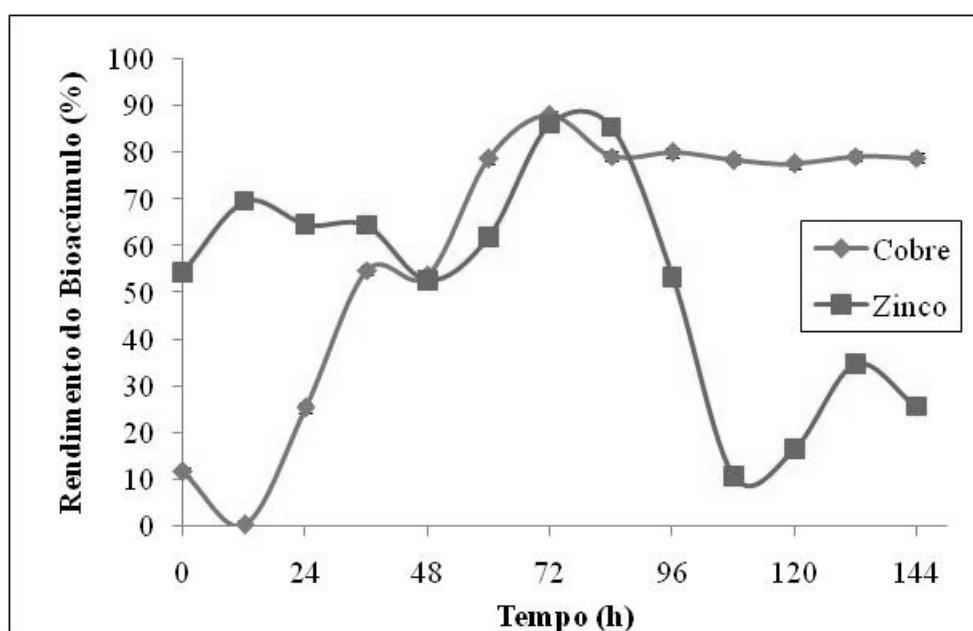


FIGURA 18 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO PELA CEPA *Candida pelliculosa* BARU05

A cepa *Candida pelliculosa* BARU05 atingiu 5,464 g/L de produção de biomassa e 87,95% de rendimento (Figuras 17 e 18) com bioacúmulo de cobre após 72 h.

A cepa BARU05 obteve após 72 horas de fermentação 87,93% de rendimento de acúmulo de zinco e 5,46 g/L de produção de biomassa (Figuras 17 e 18); observa-se que durante a cinética de bioacúmulo por parte da *Candida pelliculosa* BARU05 o rendimento não segue o mesmo comportamento. Após 84 horas de fermentação há um decaimento no rendimento, mostrando que a capacidade de bioacumulação decai significativamente.

Percebe-se, comparando os dados observados na Figura 18, que a presença de zinco no meio interfere no crescimento celular, assim como o cobre (5,464 g/L de biomassa após fermentação enriquecida com zinco contra 6,468 g/L de biomassa após fermentação sem adição de micronutrientes).

As velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram 0,013 h⁻¹ e 0,049 mg.g⁻¹.h⁻¹, respectivamente, para a cinética de cobre (parâmetros: biomassa produzida e cobre bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17), e 0,011 h⁻¹ e 0,009 mg.g⁻¹.h⁻¹, respectivamente, para a cinética de zinco (parâmetros: biomassa produzida e zinco bioacumulado em 0h e 84h; ver seção 3.17), e 0,079 h⁻¹ para a cinética sem suplementação de micronutrientes no meio (parâmetros: biomassa produzida em 0h e 12h; ver seção 3.17).

Por fim, estipulou-se, para as etapas seguintes do trabalho, 72 horas como tempo máximo de fermentação para bioacúmulo e crescimento de biomassa, tanto para cobre quanto para o zinco.

O consumo de açúcares (reduzidos e totais) é observado conforme as cinéticas apresentadas nas Figuras 19 e 20:

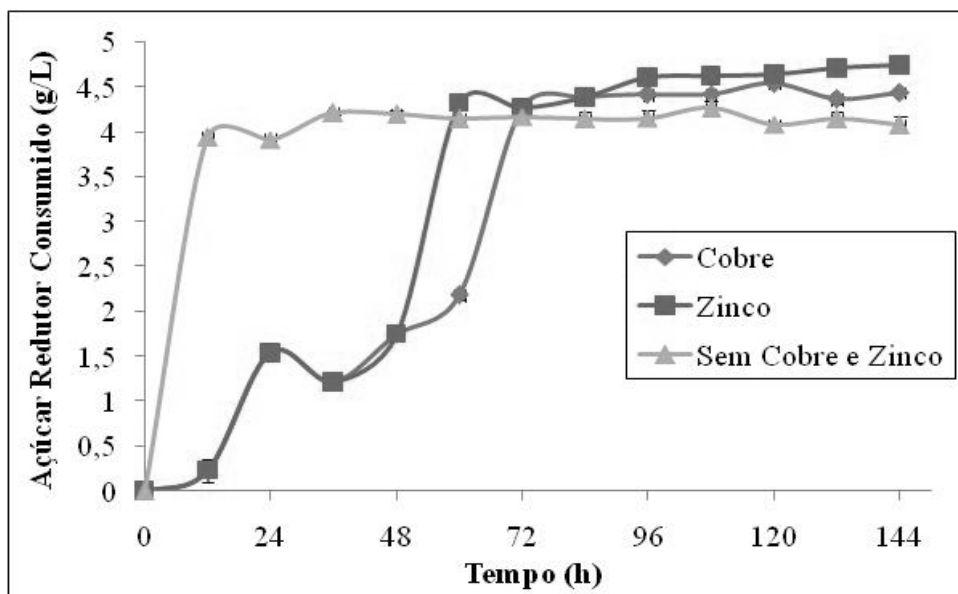


FIGURA 19 - CONSUMO DE SUBSTRATO (AÇÚCARES REDUTORES) DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO

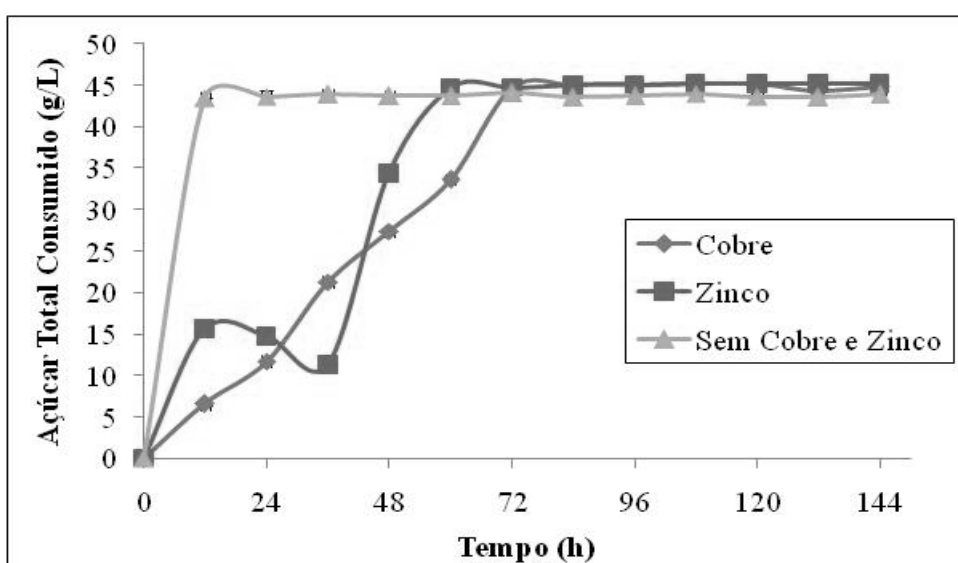


FIGURA 20 - CONSUMO DE SUBSTRATO (AÇÚCARES TOTAIS) DURANTE CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE E ZINCO E EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO COM COBRE E ZINCO

Durante a cinética de bioacúmulo de cobre, o consumo de substrato pela cepa *Candida pelliculosa* BARU05 e o crescimento celular aumentam até 72 h. O bioacúmulo de cobre é maior em 72 h de fermentação, quando praticamente todos os açúcares fermentescíveis foram consumidos como se pode observar pelas Figuras 19 e 20.

Roepecke (2007) comenta em seu trabalho, que a produção de biomassa de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRLY 27063 rica em zinco orgânico demonstrou uma maior concentração em 144 horas, onde sua concentração foi de 96.030 mg/kg. Entre as frações de zinco presentes na biomassa, a que apresentou maior quantidade em todos os tempos de cultivo foi a de zinco orgânico adsorvido.

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO E EM COBRE

4.6.1 Otimização da produção de biomassa rica em zinco

4.6.1.1 Otimização das condições físicas da produção de biomassa rica em zinco

O processo de produção de biomassa e bioacúmulo de micronutrientes em leveduras são influenciados por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal; fisiologia da célula; e condições do ambiente, como pH e temperatura (STOLL; DUNCAN, 1996).

Durante o desenvolvimento do processo, foi realizada a otimização de fatores físicos do processo de maneira a se obter um aumento da biomassa e rendimento de bioacúmulo de zinco.

Foi realizado um planejamento experimental fatorial do tipo 2^{3-0} . As variáveis estudadas foram: pH, temperatura e taxa de inoculação (Figura 21).

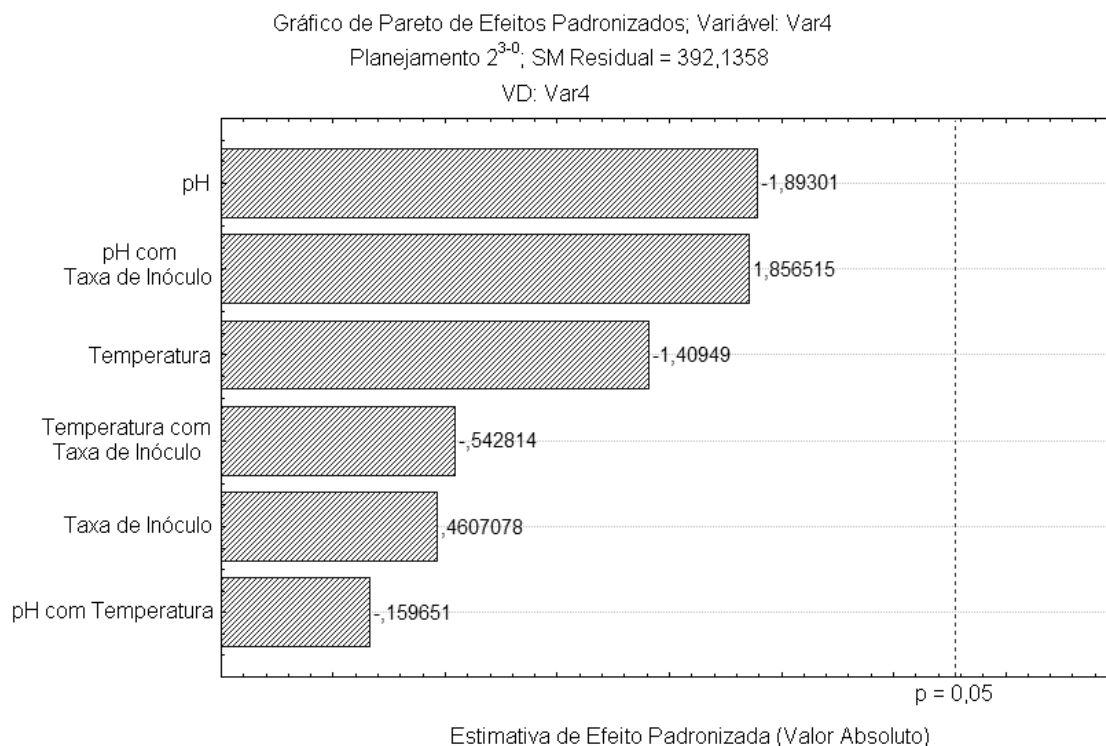


FIGURA 21 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – ZINCO – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,90478$)

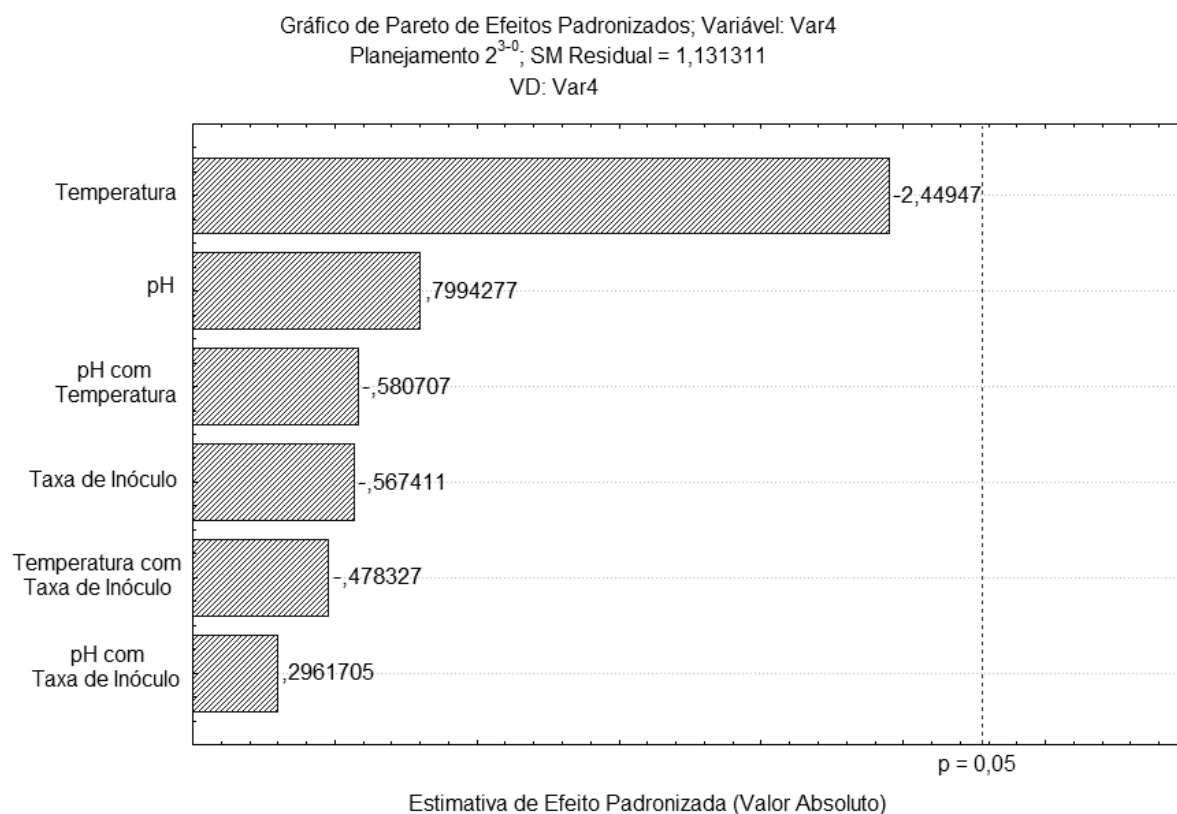


FIGURA 22 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – ZINCO – BIOMASSA ($R^2 = 0,95561$)

Conforme demonstrado nas Figuras 21 e 22, segundo o gráfico de Pareto, não houve variáveis significativas ao nível de 5 %. De fato, não houve influência destas variáveis nem sobre a produção de biomassa, nem sobre o bioacúmulo de zinco pela cepa BARU 05.

Na Tabela 20, observa-se que o melhor rendimento de bioacúmulo foi obtido no experimento 3, com 97,036 %; para a produção de biomassa, o melhor desempenho foi obtido no experimento 2, com 5,659 g/L.

TABELA 20 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO E BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES FÍSICOS – ZINCO

Experimento	Variáveis Independentes			Variáveis de Resposta	
	pH	Temperatura	Taxa de Inóculo	Biomassa Seca, g/L	Bioacúmulo, %
1	-1	-1	-1	4,635	80,174
2	+1	-1	-1	5,659	56,670
3	-1	+1	-1	3,798	97,036
4	+1	+1	-1	3,261	15,536
5	-1	-1	+1	4,554	94,992
6	+1	-1	+1	5,336	69,955
7	-1	+1	+1	2,310	43,129
8	+1	+1	+1	3,176	67,144
9	0	0	0	5,514	73,027
10	0	0	0	5,391	73,276
11	0	0	0	5,356	74,079

As variáveis físicas estudadas não foram significativas, nos níveis testados. Tal fato demonstra que além delas não exercerem influência sobre as variáveis respostas (produção de biomassa e bioacúmulo de micronutriente), podem ser fixados em valores que favoreçam a operacionalidade do processo. Neste caso, estabeleceu-se as seguintes condições físicas para a continuidade da otimização do processo: temperatura 28 °C, pH 4 e taxa de inóculo 5 %.

4.6.1.2 Otimização das condições químicas da produção de biomassa rica em zinco

A otimização das condições químicas do processo iniciou-se com a seleção da fonte de nitrogênio conforme será descrito. Os experimentos foram realizados conforme o item 4.6.1.1.

Roepke (2007) e Rajoka *et al.* (2006) descrevem que as fontes de carbono, as fontes de nitrogênio, os sais minerais, são importantes para o crescimento microbiano. A maioria dos processos biotecnológicos industriais utiliza fontes de carbono e nitrogênio a partir de misturas complexas de produtos ou subprodutos naturais de baixo custo, buscando resíduos. Dessa forma, o objetivo desse experimento foi verificar a influência da diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de biomassa e bioacúmulo de zinco.

Seleção da fonte de nitrogênio

Foram testadas, inicialmente, cinco fontes de nitrogênio todos equivalentes: uréia, extrato de levedura, sulfato de amônio, citrato de amônio e nitrato de amônio. Constatou-se que das fontes testadas a uréia (1 g/L) apresentou um rendimento de 87,25% de bioacúmulo de zinco (Figura 23). Esta foi a que também propiciou melhores resultados de produção de biomassa (7,826 g/L), seguida pelo citrato de amônia (6,562 g/L) (ver Figura 24).

A fonte de nitrogênio que menos favoreceu o crescimento da *Candida pelliculosa* BARU05 e bioacúmulo do zinco concomitantemente foi o extrato de levedura. Neste caso a produção de biomassa foi de 6,046 g/L e o bioacúmulo foi de 64,45 %.

Contudo, o padrão (sem adição de fonte de nitrogênio) apresentou uma produção de 0,223 g/L, bem inferior aos resultados obtidos em presença de uma fonte de nitrogênio. Isso demonstra que o melaço de cana diluído a 5 °Brix necessita de suplementação de fonte de nitrogênio, e talvez de outros componentes. Para os estudos seguintes, escolheu-se a uréia como fonte de nitrogênio, cuja concentração no meio será estudada posteriormente.

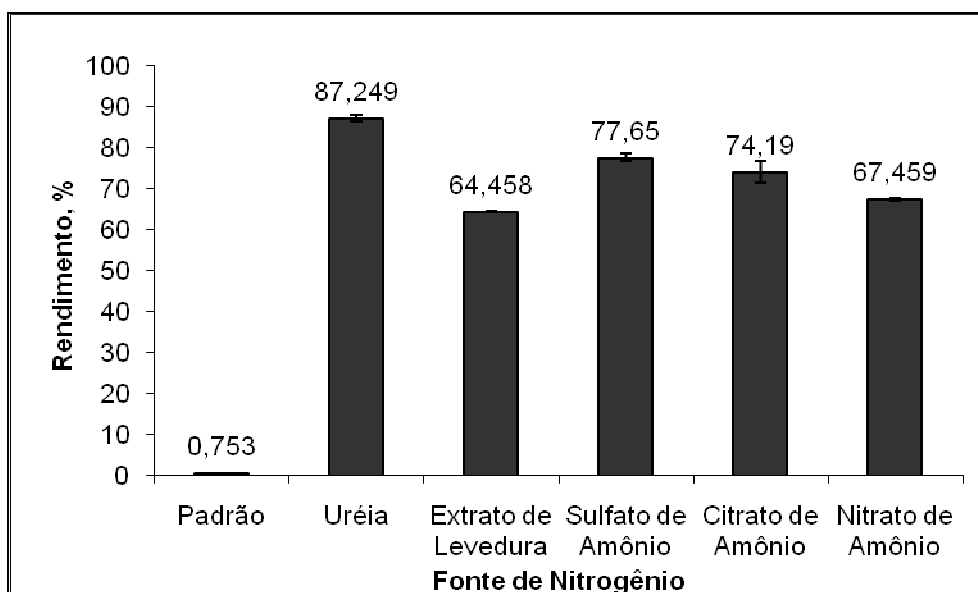


FIGURA 23 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – ZINCO

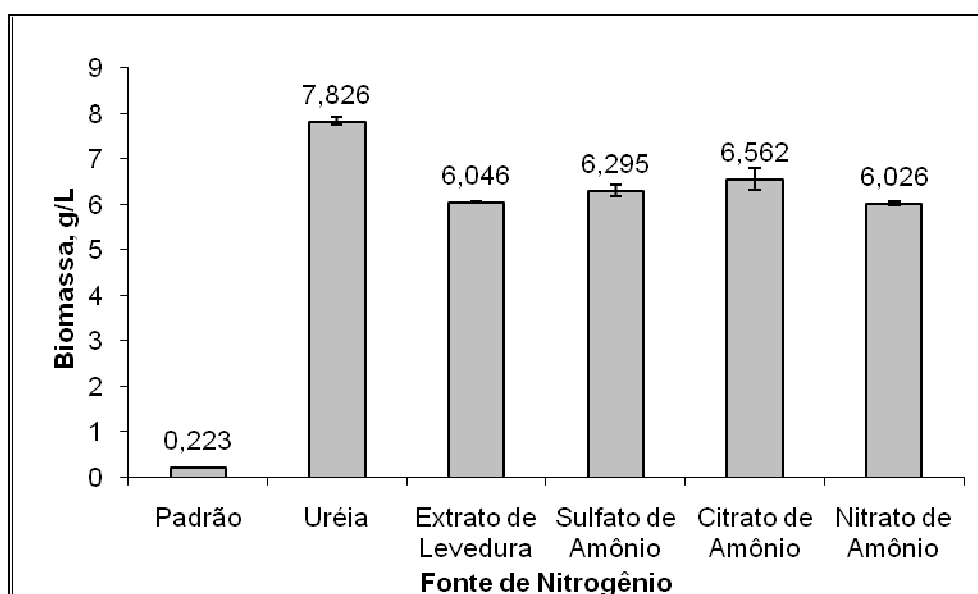


FIGURA 24 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – ZINCO

Roepcke (2007) observou em seu trabalho, ao levar em conta a quantidade de zinco acumulada pela biomassa produzida, que o melaço de soja é uma melhor fonte de carbono do que o melaço de cana-de-açúcar. Isto pode ser justificado pelo maior teor de proteína presente nesta matéria-prima, que servirá como fonte de nitrogênio orgânico para o microrganismo produzir aminoácidos em sua célula. Os aminoácidos irão formar ligações com os íons Zn^{2+} ,

produzindo o zinco orgânico. A adição de extrato de levedura com fonte de nitrogênio orgânico foi importante para aumentar o acúmulo de zinco pela levedura, porém por possuir alto custo, tem sua adição ao meio de cultivo restrito.

A mesma autora ainda afirma que não existem relatos na literatura de uso de melaço de cana-de-açúcar e de melaço de soja na produção de biomassa de levedura rica em zinco, utilizando-se a fermentação líquida. Stehlik-Thomas *et al.* (1997, 2004) utilizaram o melaço de beterraba em seus estudos, resíduo este comum na Europa, no cultivo de *S. cerevisiae* para a produção de biomassa rica em zinco, obtendo no final do experimento 70 µg/g. O uso destes subprodutos agroalimentares no meio de cultivo é de extrema importância, pois utiliza substratos de baixo custo para produzir uma substância com alto valor agregado.

Escolha da concentração do zinco

A definição da concentração limitante de zinco a ser utilizada passou por um teste preliminar onde foram testadas duas concentrações da solução de sulfato de zinco.

Roepcke (2007) comenta em sua pesquisa que o comportamento das cepas de leveduras *K.marxianus* NRRL Y8281, *S. cerevisiae* NRRL YB 2293 e *S. cerevisiae* NRRL Y2034 nas condições de cultivo estabelecidas, sob diferentes concentrações de ZnSO₄ (0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,5 g/L). Contudo, a autora constatou que o comportamento das três cepas é bastante similar: a concentração de açúcares totais consumidos nos três casos atingiu valores próximos a 0,0 g/L em 24 horas de cultivo; e o crescimento celular alcançou concentração máxima de biomassa em 24 horas de cultivo. Por isso da importância da cinética, pois, os valores máximos de produção de biomassa obtidos foram os seguintes: 10,09 g/L (*K. marxianus* NRRL Y8281, no tempo 24 horas, com presença de 0,5 g/L de ZnSO₄), 10,23 g/L (*S. cerevisiae* NRRL Y2034, no tempo 24 horas, com presença de 0,5 g/L de ZnSO₄), e 10,49 g/L (*S. cerevisiae* NRRL YB 2293, no tempo 24 horas, com presença de 0,2 g/L de ZnSO₄).

Nas Figuras 25 e 26 observa-se que o aumento da concentração do zinco, ocasiona diminuição da produção de biomassa (g/L) e do rendimento (%). O rendimento de bioacúmulo foi de 6,52% sendo que a biomassa obtida foi de 5,41 g/L ao aumentar a concentração de sulfato de zinco para 1 g/L. Isso se deve ao fato do meio se tornar mais

tóxico, dificultando principalmente a sobrevivência da espécie em estudo. Com 0,1 g/L de sulfato de zinco a produção de biomassa atingiu 9,926 g/L e o rendimento de bioacúmulo atingiu 88,70 %.

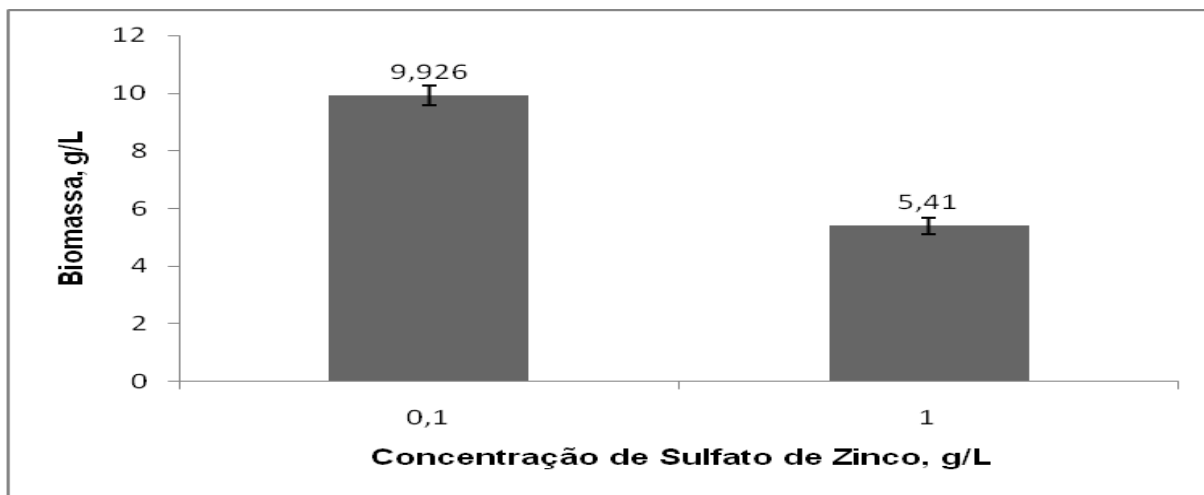


FIGURA 25 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO

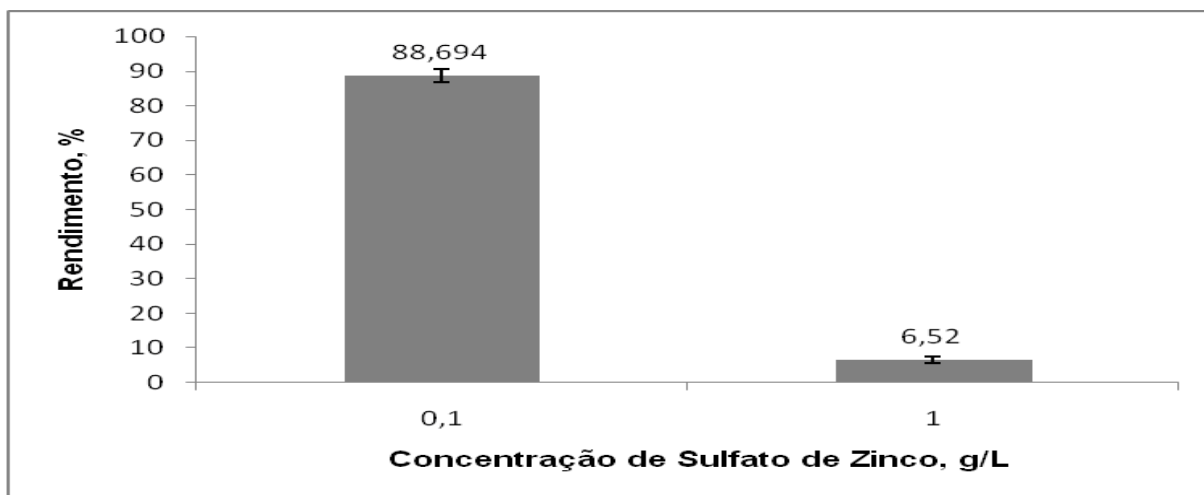


FIGURA 26 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE ZINCO EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO ADICIONADO

Stehlik-Tomas *et al.* (2004) e Roepecke (2007) constataram em seus trabalhos as dificuldades em se aumentar as concentrações do zinco e o efeito que provoca sobre a produção da biomassa e de bioacúmulo (rendimento).

O crescimento da biomassa foi 45,49% (5,49 g/L de biomassa) mais baixo para a maior concentração (1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e o rendimento de bioacúmulo foi 92,65% mais baixo (6,52 %).

Stehlik-Thomas *et al.* (2004) afirmaram que concentrações acima de 0,1 g/L de solução de sulfato de zinco tornam o meio mais tóxico. Por isso, a concentração da solução de sulfato de zinco escolhida foi de 0,1 g/L.

Primeira etapa da otimização da composição química – Planejamento do tipo fatorial incompleto de 2^{7-4} com 3 pontos centrais

O planejamento experimental do tipo fatorial incompleto 2^{7-4} com 3 pontos centrais foi utilizado para a definição da composição química do meio de produção. Nesta etapa foi verificada a influência de 7 componentes do meio (uréia, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) sobre a produção de biomassa e bioacúmulo de zinco.

Na Tabela 21, observa-se que os melhores resultados foram obtidos com a presença de uréia no nível +1, o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ no nível +1 e CaCl_2 no nível +1. A produção de biomassa atingiu 6,12 g/L e o bioacúmulo de zinco foi de 99,96 % de rendimento.

TABELA 21 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS

Experimento	Variáveis Independentes							Variáveis de Resposta	
	Sulfato Amônio	Uréia	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	Biomassa Seca, g/L	Bioacúmulo, %
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4,347	40,110
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	5,537	99,937
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	6,128	99,966
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1	4,121	29,184
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1	4,234	99,676
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	3,036	27,242
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	4,635	39,220
8	1	1	1	1	1	1	1	5,557	99,994
9	0	0	0	0	0	0	0	5,826	83,318
10	0	0	0	0	0	0	0	5,868	84,775
11	0	0	0	0	0	0	0	5,845	83,647

Stehlik-Thomas *et al.* (2004) descrevem que durante a fermentação alcoólica, ao se adicionar sais, foram detectados alterações no comportamento fisiológico da espécie *S. cerevisiae*. Os presentes autores concluíram que a adição de sais (soluções de sulfatos) deve

ocorrer a 0,1 g/L, pois acima disso é tóxico para a levedura, e a variação do pH (3 a 6) foram um dos fatores importantes no processo de bioacumulação que foi de 70 mg/kg.

O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 27, mostra que a variável $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ apresenta significância ao nível de 5 % sobre o bioacúmulo. As outras seis variáveis não foram significativas.

Observa-se, no entanto, na Figura 28 que a influência das sete variáveis estudadas não foi significativa sobre o aumento da produção de biomassa.

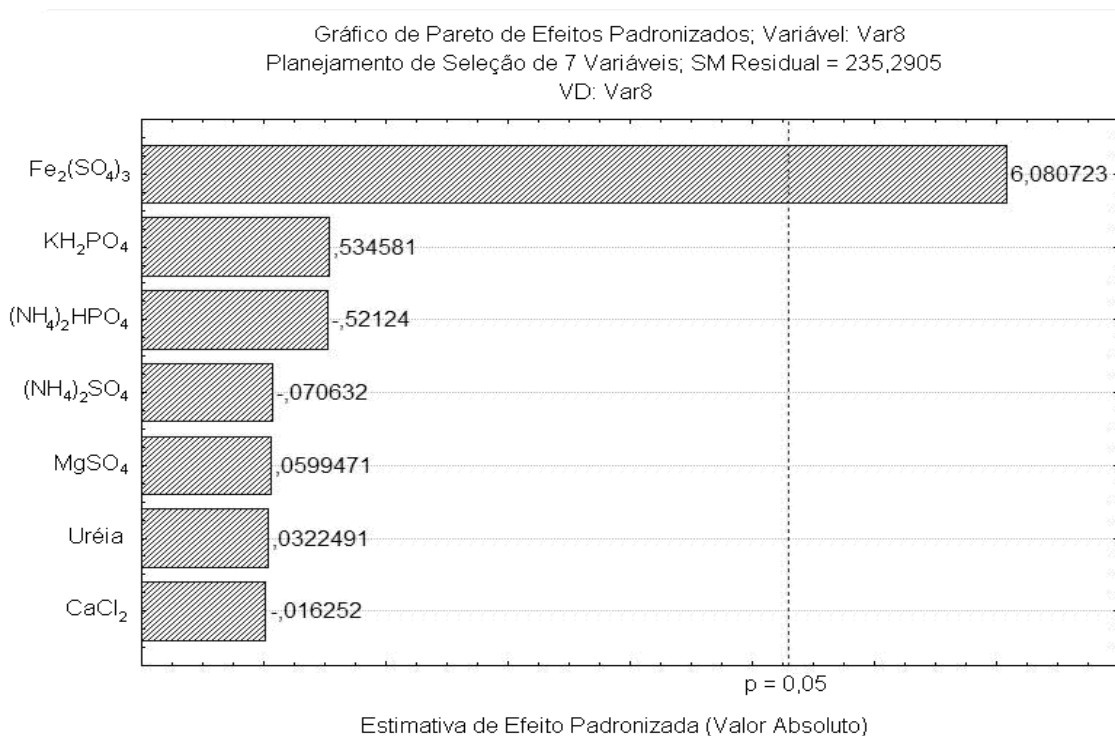


FIGURA 27 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS – ZINCO – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,94942$)

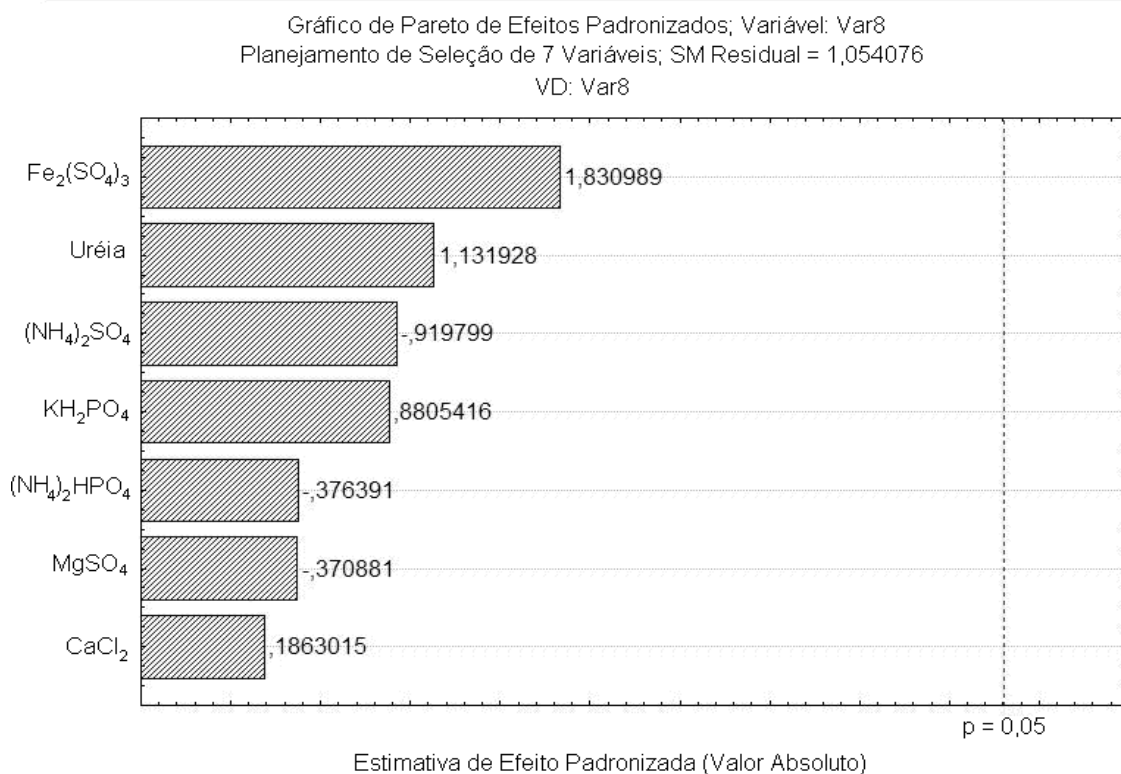


FIGURA 28 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS – ZINCO – BIOMASSA ($R^2 = 0,9666$)

Segunda etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo 2^{4-1}

Nesta etapa da otimização foram estudadas quatro variáveis, dentre elas o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ que foi significativo na etapa anterior. As outras três variáveis (uréia, CaCl_2 e °Brix) foram incluídas também com o objetivo de se fazer um estudo da concentração a ser utilizada de cada uma (de acordo com o ensaio 3 da Tabela 21). Neste caso um planejamento fatorial incompleto 2^{4-1} foi empregado com três pontos centrais (RODRIGUES; IEMA, 2005).

A Tabela 22 mostra que o experimento 5 foi o melhor com uma produção de biomassa de 8,1 g/L e rendimento de bioacúmulo de 99,26 %. O CaCl_2 deve estar presente no meio, mas em concentração mais baixa, pois em altas concentrações ele apresenta efeito negativo, o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ havia sido apontado como significativo na etapa anterior. Nesta etapa verificou-se que este elemento deve estar presente em menor concentração.

TABELA 22 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁴⁻¹

Experimento	Variáveis Independentes				Variáveis de Resposta	
	Uréia	CaCl ₂	Fe ₂ (SO ₄) ₃	°BRIX	Biomassa Seca, g/L	Bioacúmulo, %
1	-1	-1	-1	-1	4,784	83,804
2	-1	-1	1	1	7,516	94,203
3	-1	1	-1	1	7,690	86,475
4	-1	1	1	-1	4,320	73,561
5	1	-1	-1	1	8,100	99,266
6	1	-1	1	-1	4,580	84,694
7	1	1	-1	-1	4,778	72,243
8	1	1	1	1	7,334	83,018
9	0	0	0	0	6,638	84,856
10	0	0	0	0	6,872	84,208
11	0	0	0	0	6,550	84,300

Mapolelo *et al.* (2005) descrevem que a interação entre os metais com o metabolismo microbiano é importante ser acompanhado, através das variações do substrato a ser utilizado e fermentado com o processo de bioacúmulo de micronutrientes, pois o rendimento altera drasticamente com essas variações. Por isso, a importância de ser aplicado um planejamento experimental.

O diagrama de Pareto (Figura 29) apresenta que as variáveis CaCl₂ e Brix, foram significativas sobre o bioacúmulo. Recomenda-se igualmente o aumento da concentração em °Brix do meio e a redução da concentração de CaCl₂, para o aumento do processo de bioacumulação.

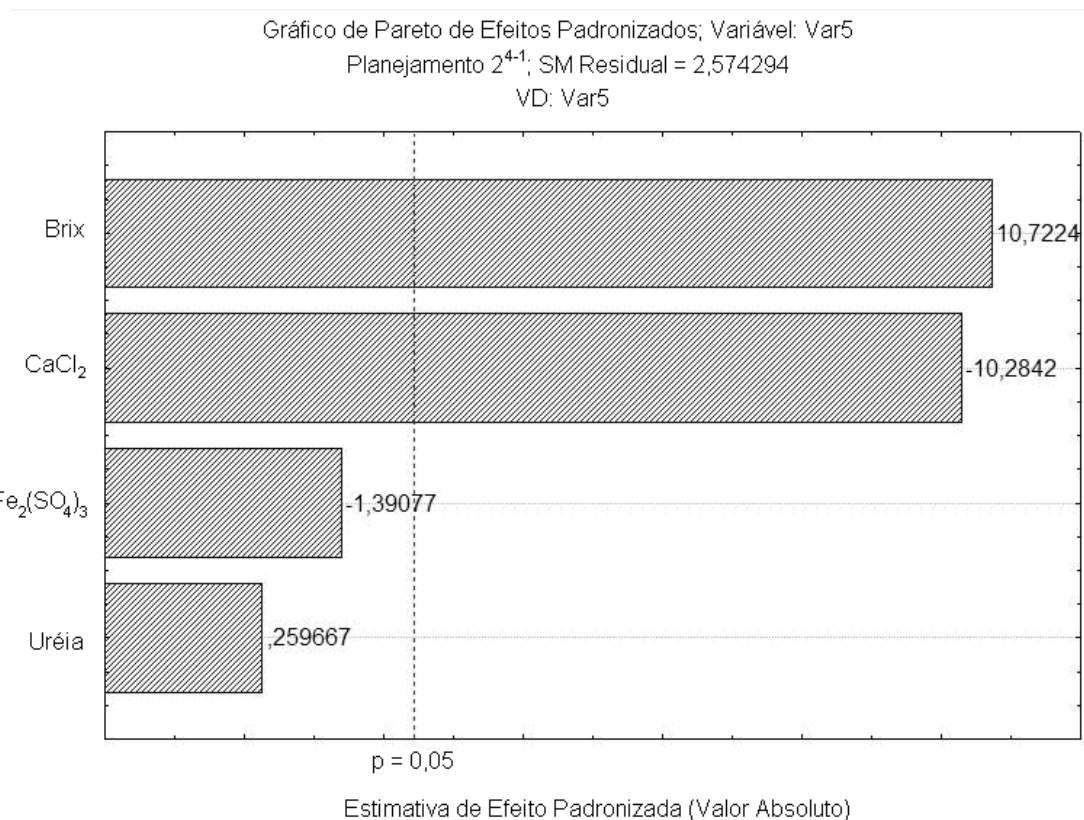


FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,97377$)

Na Figura 30, o diagrama de Pareto apresenta, que somente a variável °Brix (concentração do melaço) teve um efeito significativo sobre a produção de biomassa. As variáveis °Brix e uréia foram estudadas na etapa seguinte para uma melhor definição de suas concentrações do meio. A variável CaCl₂ foi fixada na concentração mais baixa já que teve influência nestas condições. Paralelamente, o CaCl₂ foi testado (presença e ausência) e não houve influência sobre a produção da biomassa e nem sobre o rendimento de bioacúmulo.

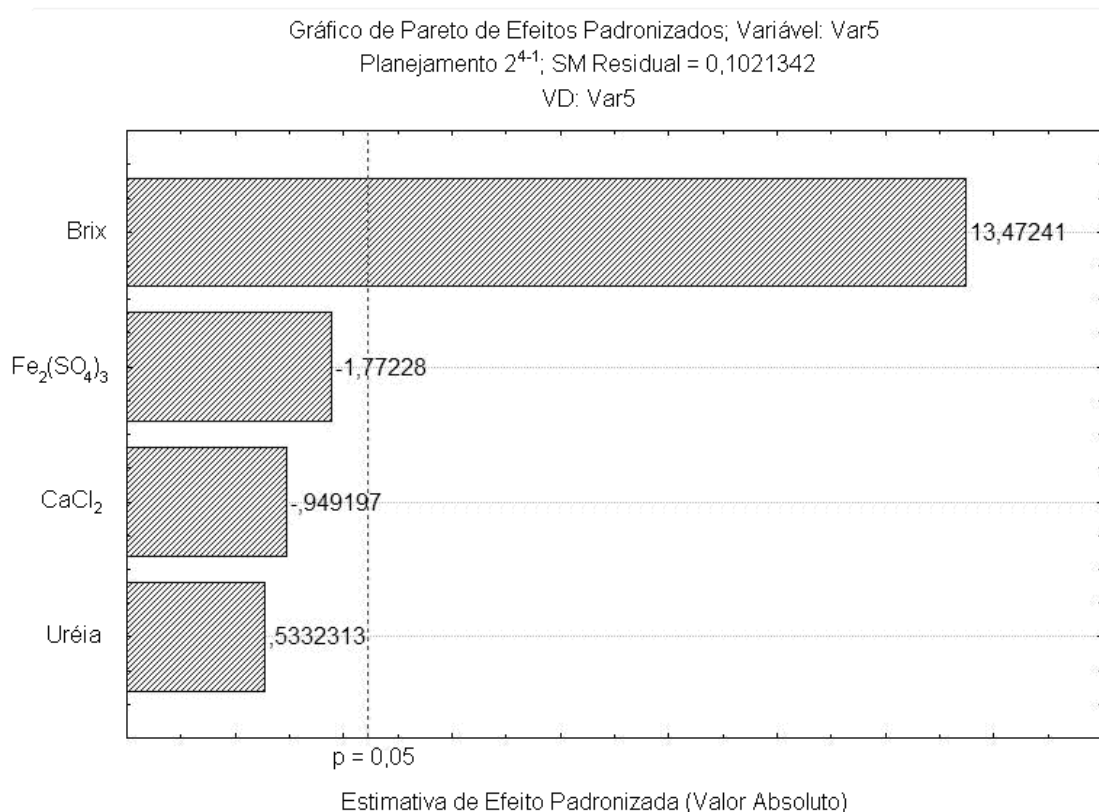


FIGURA 30 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – BIOMASSA ($R^2 = 0,96872$)

Engl e Kunz (1995) descobriram que a maior adsorção do zinco à biomassa de *S. cerevisiae* ocorre quando esta é obtida através de cultivo com meio suplementado com fosfato, o qual gerou uma alta seletividade para este metal e não o bioacúmulo.

Terceira etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental do tipo rotacional composto central - DCCR

Um planejamento experimental do tipo rotacional composto central – DCCR – 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e mais os 3 pontos centrais foi empregado nesta etapa para o estudo do efeito das concentrações de uréia e °Brix (concentração do melaço) sobre a produção de biomassa e bioacúmulo de zinco. Foram realizados 11 experimentos.

Na Tabela 23, pode-se observar que as melhores condições foram encontradas no ponto central, com 90,10 % de rendimento médio e 12,406 g/L de biomassa média.

TABELA 23 - BIOACÚMULO DE ZINCO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR

Experimento	Variáveis Independentes		Variáveis de Resposta	
	Uréia	BRIX	Biomassa Seca, g/L	Bioacúmulo, %
1	-1	-1	5,350	75,316
2	1	-1	6,420	97,086
3	-1	1	5,810	49,741
4	1	1	5,256	87,536
5	-1,41421	0	7,588	95,549
6	1,41421	0	5,536	85,108
7	0	-1,41421	4,390	51,382
8	0	1,41421	5,454	90,656
9	0	0	12,590	91,097
10	0	0	12,286	85,918
11	0	0	12,342	93,283

É possível verificar que o aumento da produção de biomassa foi de 24,98% em relação à concentração obtida na etapa de seleção de cepas.

Rodrigues e Iema (2005) descrevem a importância desse planejamento experimental do tipo rotacional composto central (DDC), pois através dessa ferramenta são obtidos os melhores ensaios e conseqüentemente os melhores resultados.

Conforme a Figura 31, o termo linear e quadrático foi significativo. O termo quadrático do °Brix (concentração do melaço) foi significativo. Os termos lineares das interações entre a uréia e °Brix e do °Brix sozinho não apresentaram influência sobre a produção de biomassa.

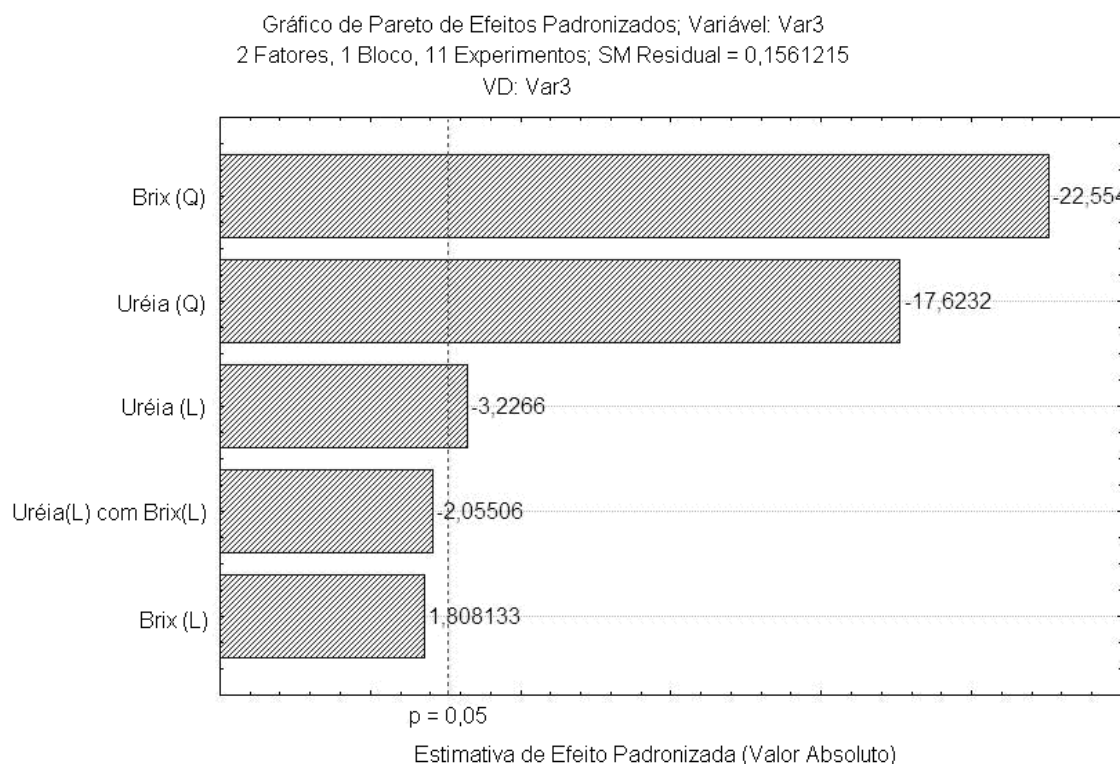


FIGURA 31 - GRÁFICO DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR ($R^2=0,966$)

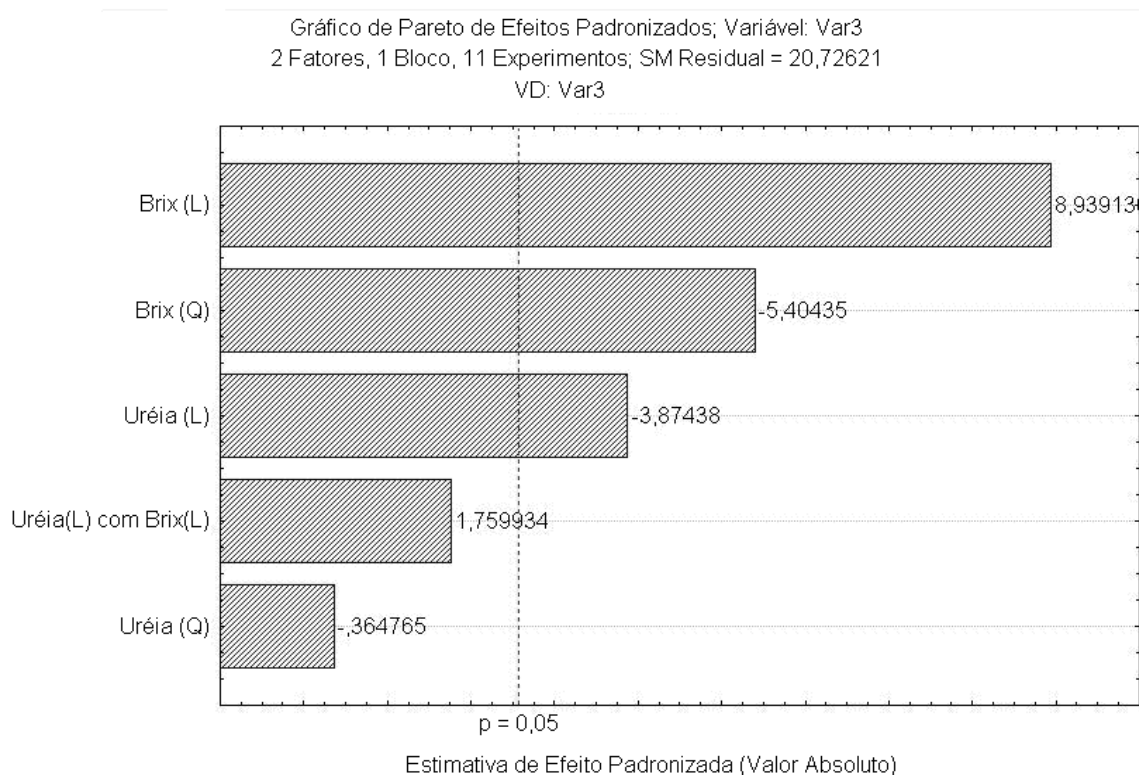


FIGURA 32 - GRÁFICO DE PARETO PARA BIOACÚMULO DE ZINCO DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR ($R^2=0,944$)

O gráfico de Pareto (Figura 32) mostra que, diferentemente da produção de biomassa, o processo de bioacúmulo de zinco é influenciado tanto linearmente (L) quanto em ordem quadrática (Q) pela concentração do melaço de cana, sendo que a variável uréia também influi apenas linearmente (L), indicando que essas variáveis devem se manter noníveis centrais de concentração.

Isso pode ser confirmado nas Figuras 33 e 34 (superfícies de resposta), as quais indicam as melhores condições para concentração do melaço de cana (°Brix) e uréia no processo de produção de biomassa e bioacúmulo de zinco. É possível verificar através das superfícies de resposta e curvas de contorno que tanto para a concentração de uréia como para a concentração do melaço (°Brix) a faixa ótima situa-se em torno dos pontos centrais (2 g/L e 7,5° Brix, respectivamente).

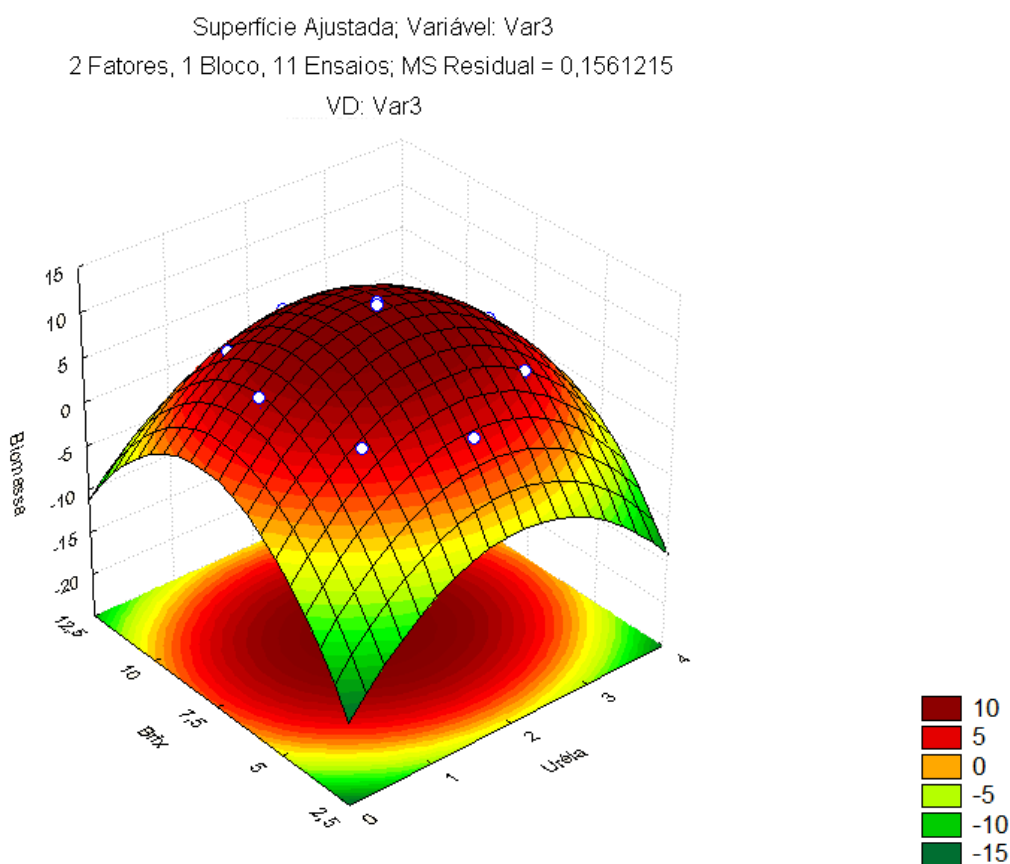


FIGURA 33 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR

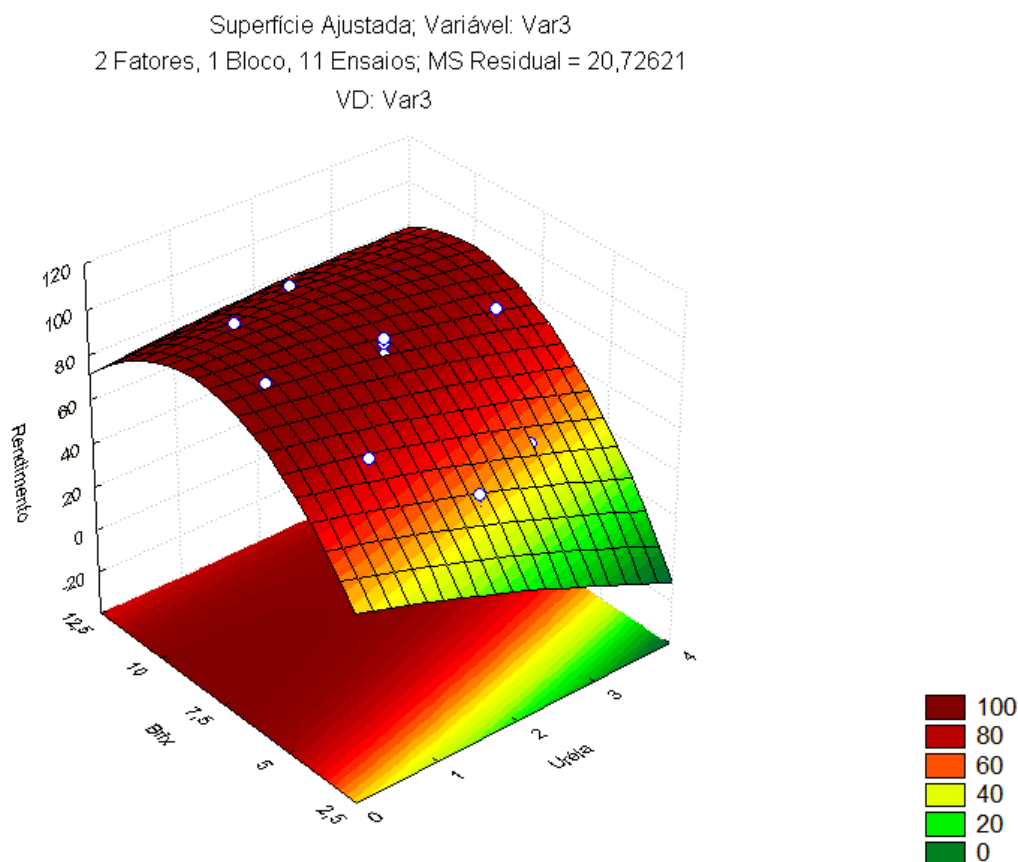


FIGURA 34 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA BIOACÚMULO DE ZINCO DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR

Roepecke (2007) descreve que o melhor resultado obtido de concentração de zinco total acumulado na biomassa produzida por *P. guilliermondii* Wickerham NRRL 27063 em seu planejamento experimental foi de 75.090 mg/kg, sob as seguintes condições: ZnSO_4 , 10,0 g/L; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,1 g/L.

Os modelos matemáticos obtidos para as variáveis estudadas que representam a produção de biomassa e rendimento de bioacúmulo do processo estão demonstrados abaixo:

Modelo de produção de biomassa

$F(x,y) = 12,406000110722 - 0,45074600041788x - 2,9302564245792x^2 + 0,2525905662693y - 3,750260555719y^2 - 0,406xy$, onde $F(x,y)$ é a biomassa produzida (em g/L), x é o nível de uréia, e y é o nível de concentração de meio (melaço).

Modelo de bioacúmulo de zinco

$P(x,y) = 90,099299440457 - 6,2361621140116x - 0,69881545536586x^2 + 14,388334111872y - 10,353617144064y^2 + 4,0061417795427xy$, onde $P(x,y)$ é o rendimento (em %), x é o nível de uréia, e y é o nível de concentração de meio (melaço).

Validação da otimização das condições físico-químicas do processo

Nas Tabelas 24 e 25 observa-se pelo grau de variação explicada ($R^2 \geq 0,9$) que, de acordo com a análise de teste de hipótese descrito na seção 3.10.3, não houve diferença significativa entre os resultados empíricos e teóricos, demonstrando a validação para os planejamentos experimentais de ambos os processos de bioacúmulo e produção de biomassa para zinco (presente trabalho).

TABELA 24 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS

Análise por ANOVA ($R^2 = 0,9777$)				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.00010	0.00010	0.0002 (não significativo para $p \geq 0.05$)
Resíduo	2	0.00218	0.00109	
Total	3	0.00218		

GL: 1, 2 $F_{\text{crítico}}(5\%) = 0.0013$ $F = 0.0013$ $p < 0.05097$

Legenda: FV – fonte de variação; GL – grau de liberdade; SQ – soma de quadrado; QM – quadrado médio.

TABELA 25 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA BIOACÚMULO DE ZINCO NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS

Análise por ANOVA ($R^2 = 0,9592$)				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.00059	0.00059	0.0063 (não significativo para $p \geq 0.05$)
Resíduo	2	0.18850	0.09425	
Total	3	0.18909		

Legenda: FV – fonte de variação; GL – grau de liberdade; SQ – soma de quadrado; QM – quadrado médio.

Por fim, o presente experimento demonstrou que as melhores condições físicas para o processo de bioacúmulo e produção de biomassa: pH 4, taxa de inóculo de 5% e 28 ° C. As melhores condições dos fatores químicos ficou com a concentração de 10 °Brix de melaço de cana, com 3 g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e 0,1 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.

4.6.2 Otimização da produção de biomassa rica em cobre

4.6.2.1 Otimização das condições físicas da produção de biomassa rica em cobre

Com o mesmo objetivo do zinco, houve o interesse em aumentar a produção de biomassa e o bioacúmulo de cobre (rendimento). Portanto, as variáveis físicas foram igualmente estudadas. O efeito da temperatura, pH e taxa de inóculo sobre a produção de biomassa e bioacúmulo, foi estudado utilizando a estratégia de planejamento experimental.

Um planejamento experimental do tipo 2^{3-0} com três pontos centrais foi aplicado com efeitos lineares de cada variável e interações lineares entre duas variáveis estudadas (total de 11 experimentos). Rodrigues e Iemma (2005) afirmam que esse planejamento experimental é importante para dar suporte e detectar os melhores ensaios/variáveis que contribuem ao bioprocessamento de interesse.

A Figura 35 apresenta o diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis físicas sobre o bioacúmulo de cobre pela cepa *Candida pelliculosa* (BARU05). Nenhuma das variáveis estudadas foram significativas no nível de 5 % ($p < 0,05$) sobre o bioacúmulo do cobre.

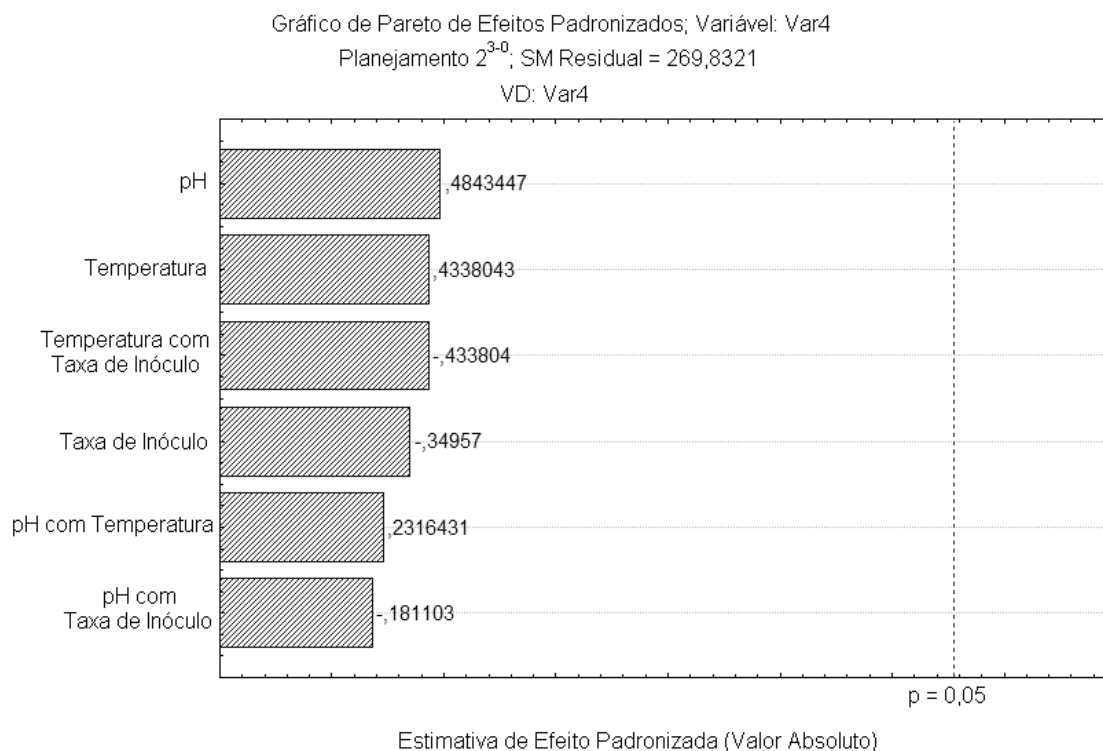


FIGURA 35 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – COBRE – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,97006$)

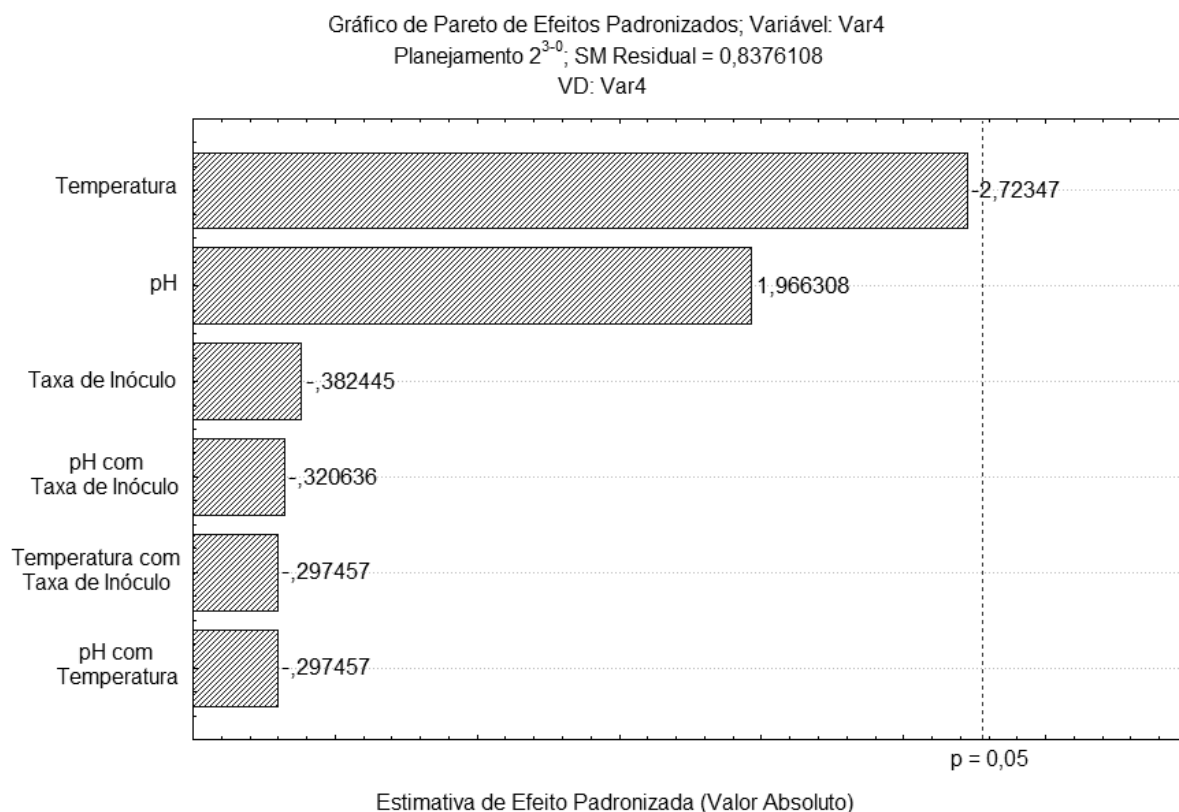


FIGURA 36 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO FATORIAL – FATORES FÍSICOS – COBRE – BIOMASSA ($R^2 = 0,94538$)

A Tabela 26 mostra os resultados dos experimentos sobre a produção de biomassa e bioacúmulo de cobre. Os melhores resultados foram obtidos nas condições estabelecidas pelo ponto central em termos de bioacúmulo com uma produção de biomassa média de 5,683. Após estes experimentos foram estabelecidas as seguintes condições físicas para os experimentos posteriores: pH 6, taxa de inóculo de 7,5 % e 30 °C.

Stehlik-Thomas *et al.* (2004) demonstram em sua pesquisa que uma solução de 0,1 g/L de sulfato de cobre foi considerada ideal, pelo fato de acima desse valor ser tóxico para as células de leveduras, apresentando no final do experimento, uma concentração de 110 mg/kg de biomassa de levedura incorporada com cobre.

TABELA 26 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO E BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES FÍSICOS – COBRE

Experimento	Variáveis Independentes			Variáveis de Resposta	
	Ph	Temperatura	Taxa de Inóculo	Biomassa Seca, g/L	Bioacúmulo, %
1	-1	-1	-1	4,59	57,263
2	+1	-1	-1	6,13	61,764
3	-1	+1	-1	3,08	64,112
4	+1	+1	-1	4,50	75,070
5	-1	-1	+1	4,61	59,807
6	+1	-1	+1	6,00	61,177
7	-1	+1	+1	2,98	57,655
8	+1	+1	+1	3,72	63,329
9	0	0	0	5,72	85,637
10	0	0	0	5,64	86,048
11	0	0	0	5,69	82,331

4.6.2.2 Otimização das condições químicas da produção de biomassa rica em cobre

Seleção da fonte de nitrogênio

Da mesma maneira como foi estudado para o bioacúmulo e produção de biomassa com zinco, foram testadas, 5 fontes de nitrogênio: uréia, extrato de levedura, sulfato de amônio, citrato de amônio e nitrato de amônio. Constatou-se que a uréia (1 g/L) propiciou um rendimento de bioacúmulo de 84,92% (Figura 38). Esta fonte de nitrogênio foi também a que conduziu aos melhores resultados de produção de biomassa (7,55 g/L), seguida pelo extrato de levedura (6,61 g/L) (ver Figura 37).

Contudo, o controle sem adição de fonte de nitrogênio propiciou um crescimento de 0,225 g/L, sendo a 96,47% menor do que o melhor resultado obtido nos ensaios nos quais foram adicionadas as fontes citadas no parágrafo anterior. De fato, o melaço de cana estava diluído a 5 °Brix, portanto é justificada a necessidade de se suplementar o meio, já que o interesse do trabalho é também aumentar a produção de biomassa da levedura.

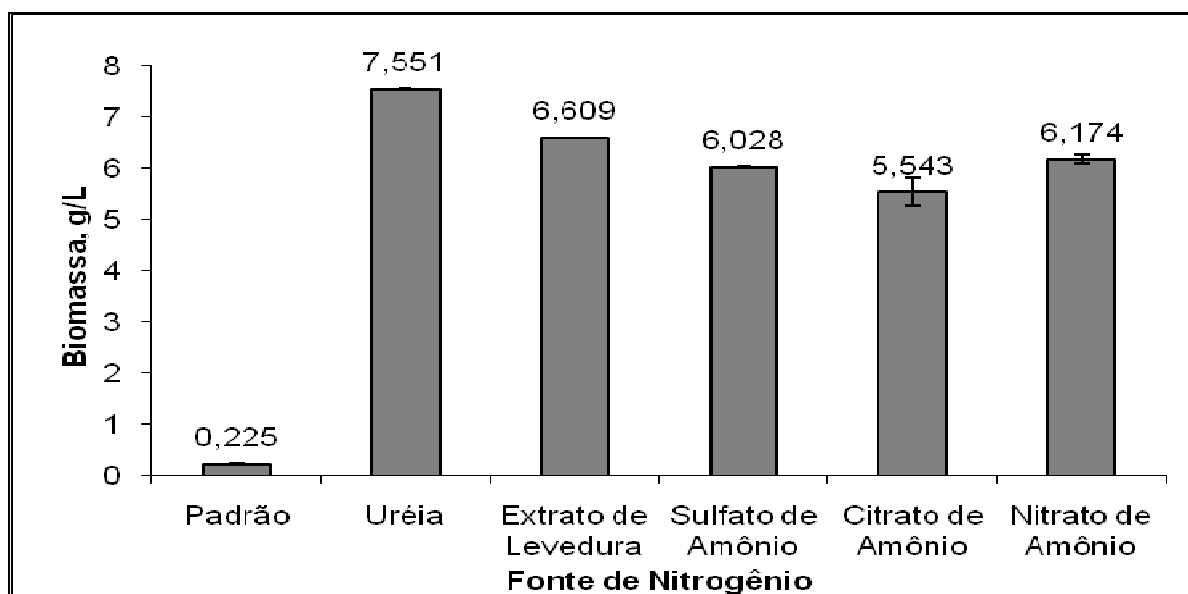


FIGURA 37 - EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA – COBRE

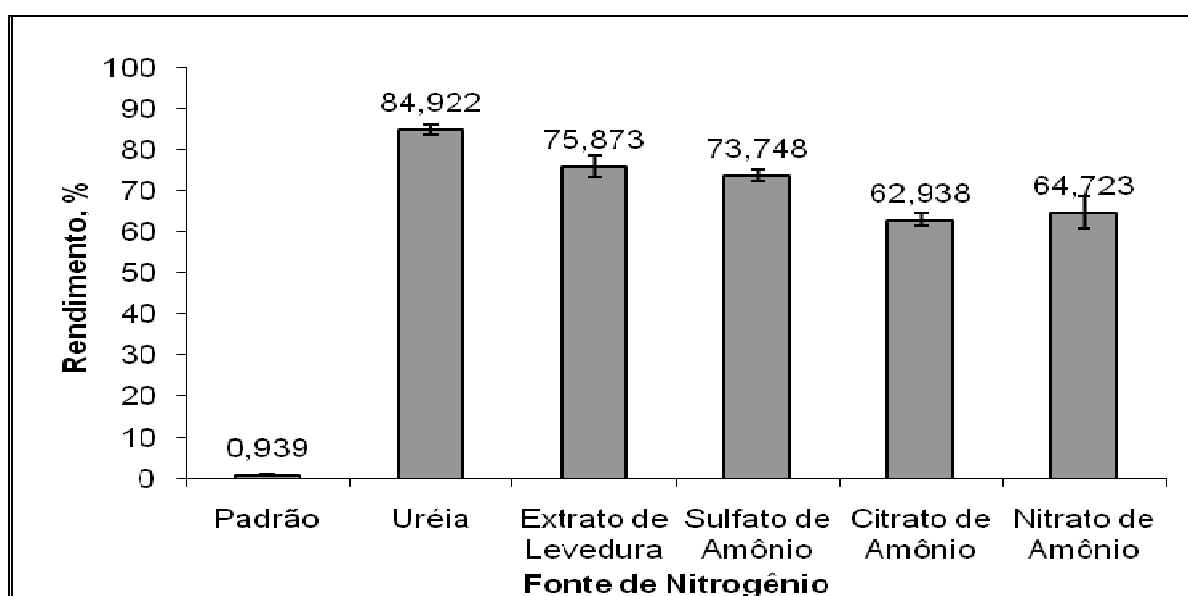


FIGURA 38 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DURANTE ENSAIOS DE SELEÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO – COBRE

Escolha da concentração do cobre

A concentração tóxica de cobre para a cepa *Candida pelliculosa* BARU05 foi testada variando-se a concentração de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ no meio.

As Figuras 39 e 40 mostram que o aumento da concentração de sulfato de cobre (0,1 g/L para 1 g/L) influenciou a produção de biomassa e rendimento do bioacúmulo de cobre. A produção de biomassa diminuiu 45,5 % e o rendimento do bioacúmulo de cobre caiu em 92,65 %. Verifica-se que a concentração de sulfato de cobre deve ser fixada em baixos valores (0,1 g/L).

Gönen e Aksu (2008) e Stehlik-Thomas *et al.* (2004) descrevem que elevados níveis de sulfato de cobre nos processos fermentativos, o rendimento diminui devido ao efeito de toxicidade do meio mais concentrado. Desse modo a concentração de 0,1 g/L de sulfato de cobre foi escolhida para os estudos posteriores.

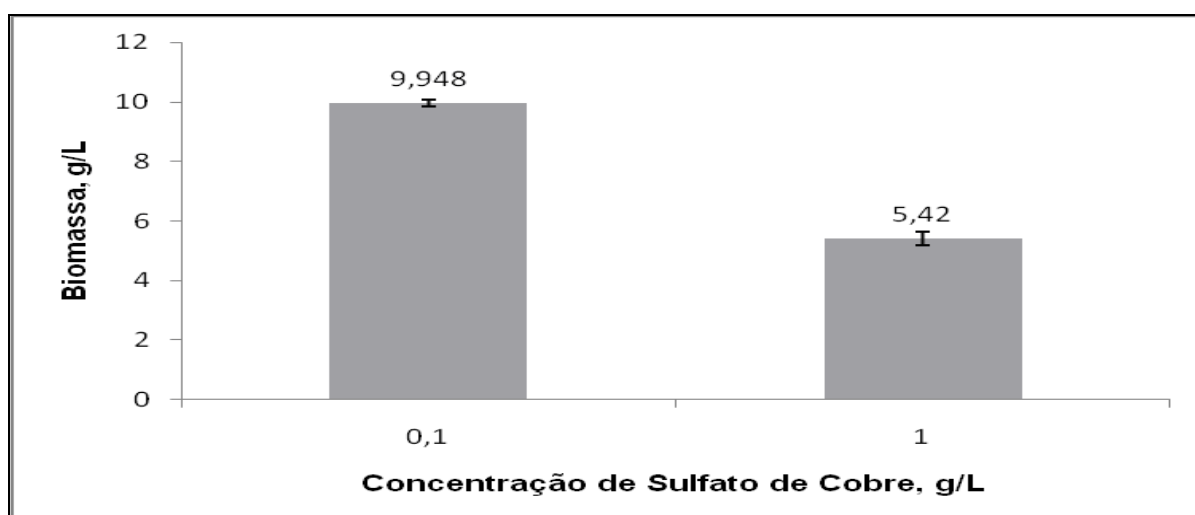


FIGURA 39 - CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

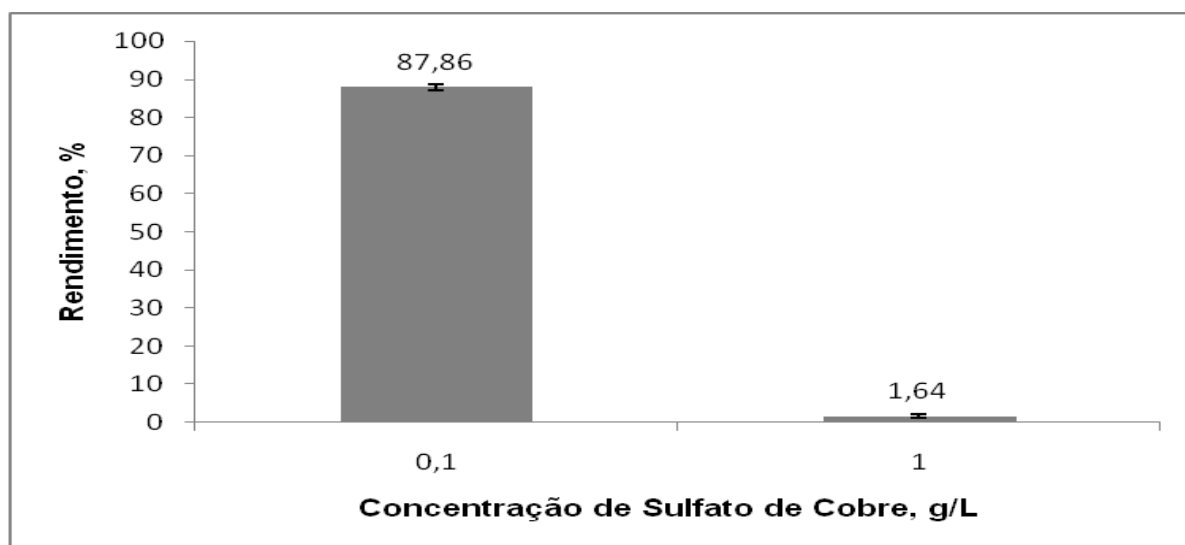


FIGURA 40 - RENDIMENTO DE BIOACÚMULO DE COBRE EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE

Estudos desenvolvidos por Souza *et al.*, (2008) abordam que foi nas menores concentrações iniciais que ocorreram os índices de remoção do cobre percentual (R%) mais elevados, o que pode indicar que as biomassas das linhagens analisadas tinham maior capacidade para bioabsorção de metais pesados de soluções diluídas de cobre e outros metais.

Primeira etapa da otimização das concentrações químicas – Planejamento do tipo fatorial incompleto de 2^{7-4} com 3 pontos centrais

A Tabela 27 apresenta os resultados do estudo do efeito de sete variáveis sobre o processo de produção de biomassa rica em cobre. São elas: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. O maior rendimento de bioacúmulo de cobre pela biomassa da cepa *Candida pelliculosa* (BARU05) foi de 99,31 % com uma produção de biomassa de 6,18 g/L no experimento 6. Neste experimento $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e CaCl_2 estavam presentes no meio.

TABELA 27 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS

Experimento	Variáveis Independentes							Variáveis de Resposta	
	Sulfato Amônio	Uréia	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	Biomassa Seca (g/L)	Bioacúmulo (%)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	5,019	76,558
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	4,629	41,278
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	4,322	50,474
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1	4,844	51,979
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1	4,357	21,214
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	6,180	99,307
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5,738	67,529
8	1	1	1	1	1	1	1	4,438	94,616
9	0	0	0	0	0	0	0	4,747	50,474
10	0	0	0	0	0	0	0	4,742	50,976
11	0	0	0	0	0	0	0	4,747	50,475

No diagrama de Pareto abaixo (Figura 41) observa-se que a variável CaCl_2 foi a única significativa para o aumento de bioacúmulo de cobre pela cepa *Candida pelliculosa* BARU05.

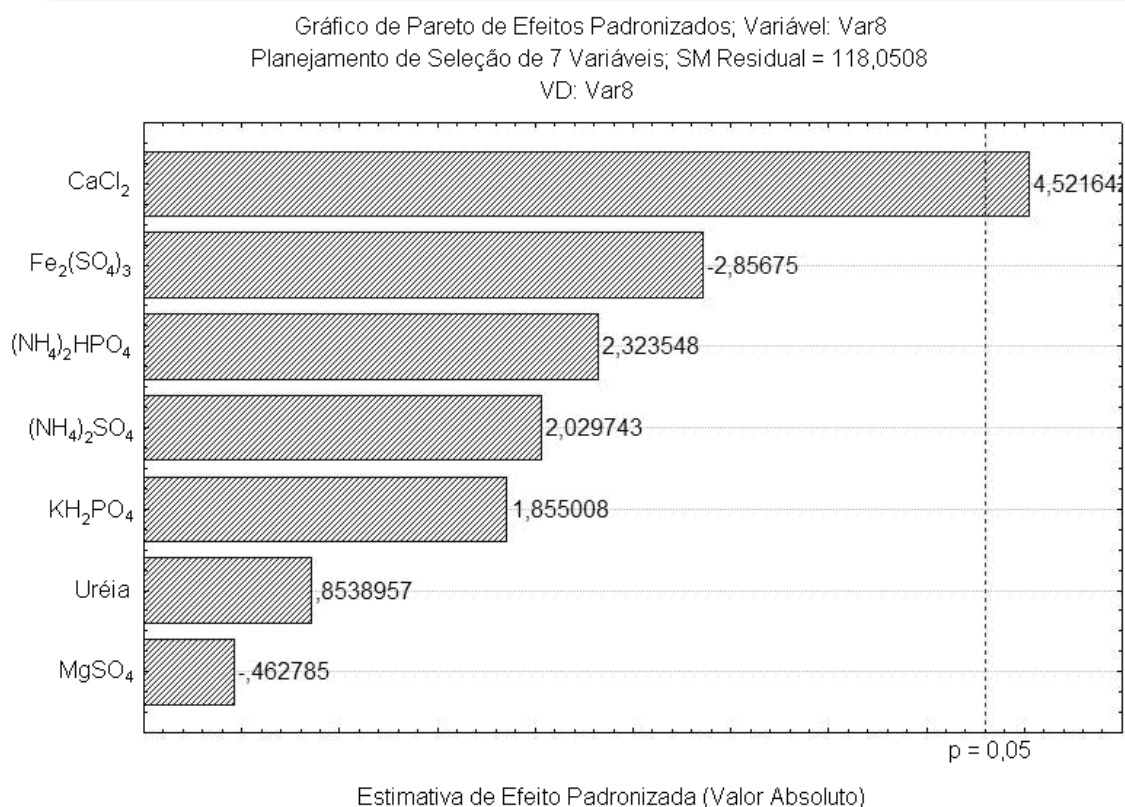


FIGURA 41 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS – COBRE – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,95507$)

No que se refere à produção de biomassa, as variáveis $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e MgSO_4 foram significativas (Figura 42) e favoráveis para a ausência desses sais no meio.

Conforme o diagrama de Pareto, estas concentrações deveriam ser diminuídas na próxima etapa, o que seria mais difícil, já que as concentrações utilizadas eram pequenas. Portanto, a escolha das variáveis utilizadas na próxima etapa de otimização foi realizada com base nos melhores resultados alcançados no experimento 6 (Tabela 27). As variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e CaCl_2 foram escolhidas para a próxima etapa de otimização incluindo também a concentração do melaço (°Brix).

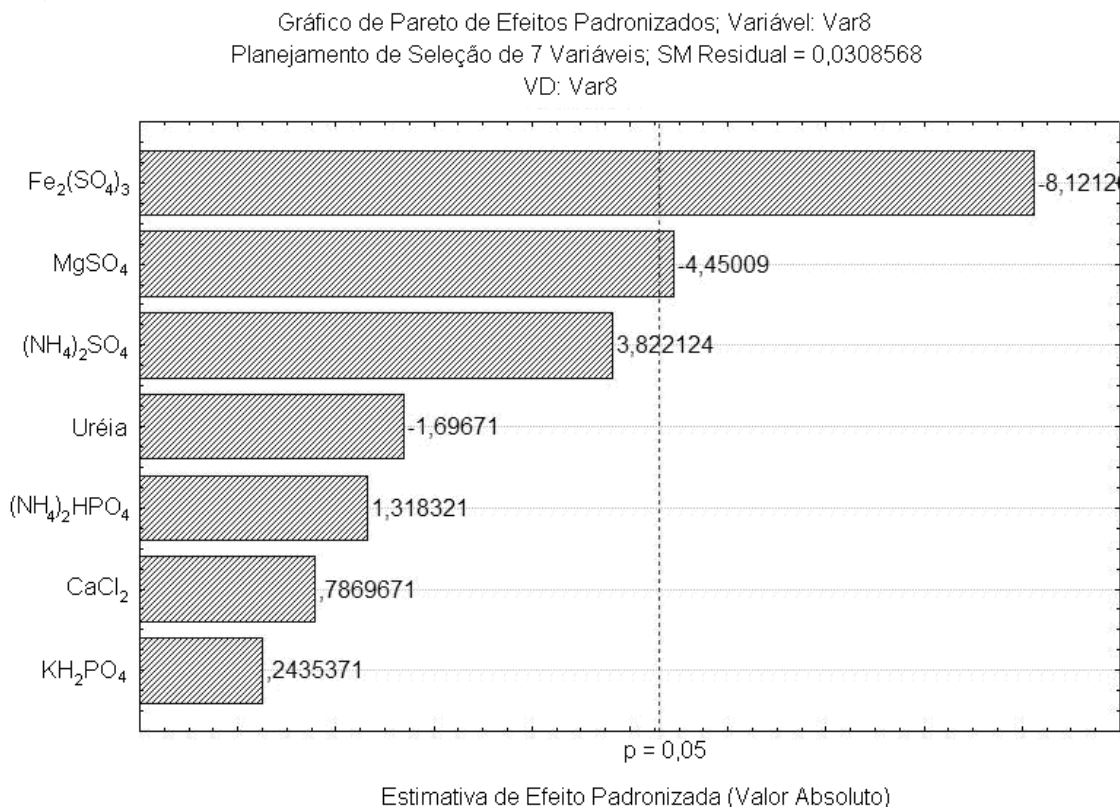


FIGURA 42 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO DO TIPO FATORIAL INCOMPLETO DE 2^{7-4} COM 3 PONTOS CENTRAIS – FATORES QUÍMICOS – COBRE – BIOMASSA ($R^2 = 0,98142$)

Segunda etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental fatorial incompleto do tipo 2^{4-1}

Um segundo planejamento experimental fatorial incompleto do tipo 2^{4-1} foi realizado. Esse planejamento segue conforme a descrição dos autores Rodrigues e Iemma (2005).

Os resultados desta etapa estão apresentados na Tabela 28. A maior produção de biomassa ocorreu no experimento 3, ou seja, 12,74 g/L. No entanto, o maior bioacúmulo ocorreu nas condições do experimento 1 (99,30 %).

TABELA 28 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1}

Experimento	Variáveis Independentes				Variáveis de Resposta	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	CaCl ₂	BRIX	Biomassa Seca (g/L)	Bioacúmulo (%)
1	-1	-1	-1	-1	7,906	99,298
2	-1	-1	1	1	9,470	73,581
3	-1	1	-1	1	12,744	87,092
4	-1	1	1	-1	7,654	81,655
5	1	-1	-1	1	9,17	52,243
6	1	-1	1	-1	7,778	30,635
7	1	1	-1	-1	7,374	75,635
8	1	1	1	1	10,220	19,082
9	0	0	0	0	9,712	94,600
10	0	0	0	0	9,466	94,282
11	0	0	0	0	9,320	94,009

Kaduková e Virciková (2005) descrevem a importância de se conhecer o metabolismo microbiano, estudando todas as variáveis possíveis para aumentar o bioacúmulo do cobre e reduzir os custos do bioprocesso. Com o planejamento experimental aplicado e a obtenção de diagramas de Pareto (Figura 43 e 44), é possível verificar quais são as variáveis significativas sobre o aumento da biomassa e o rendimento de bioacumulação.

O diagrama de Pareto (Figura 43) mostra que a concentração do melaço (10 °Brix) foi o fator mais significativo no nível de 5%. Os outros fatores não foram significativos sobre a produção de biomassa.

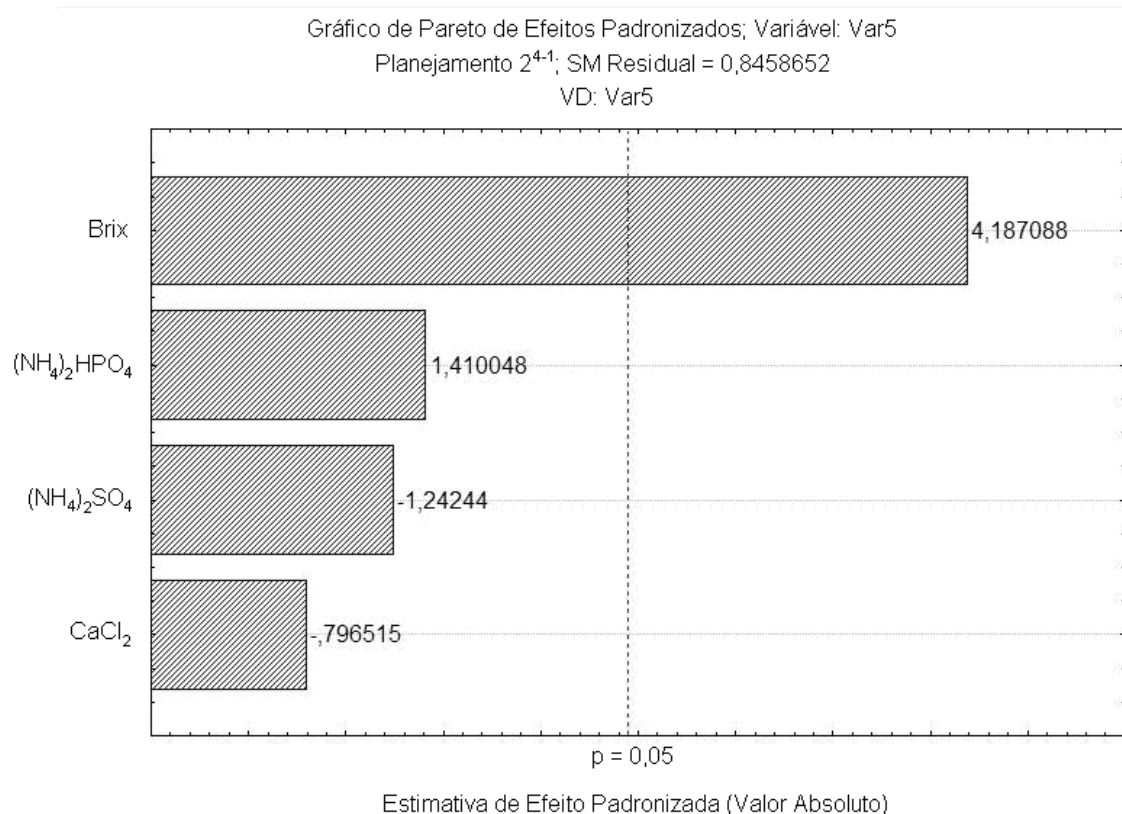


FIGURA 43 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – BIOMASSA ($R^2 = 0,98338$)

A Figura 44 mostra que as variáveis CaCl_2 , °Brix e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ não foram significativas no nível de 5 %. Apenas o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi significativo (nível de 5%) no processo de bioacumulação do cobre.

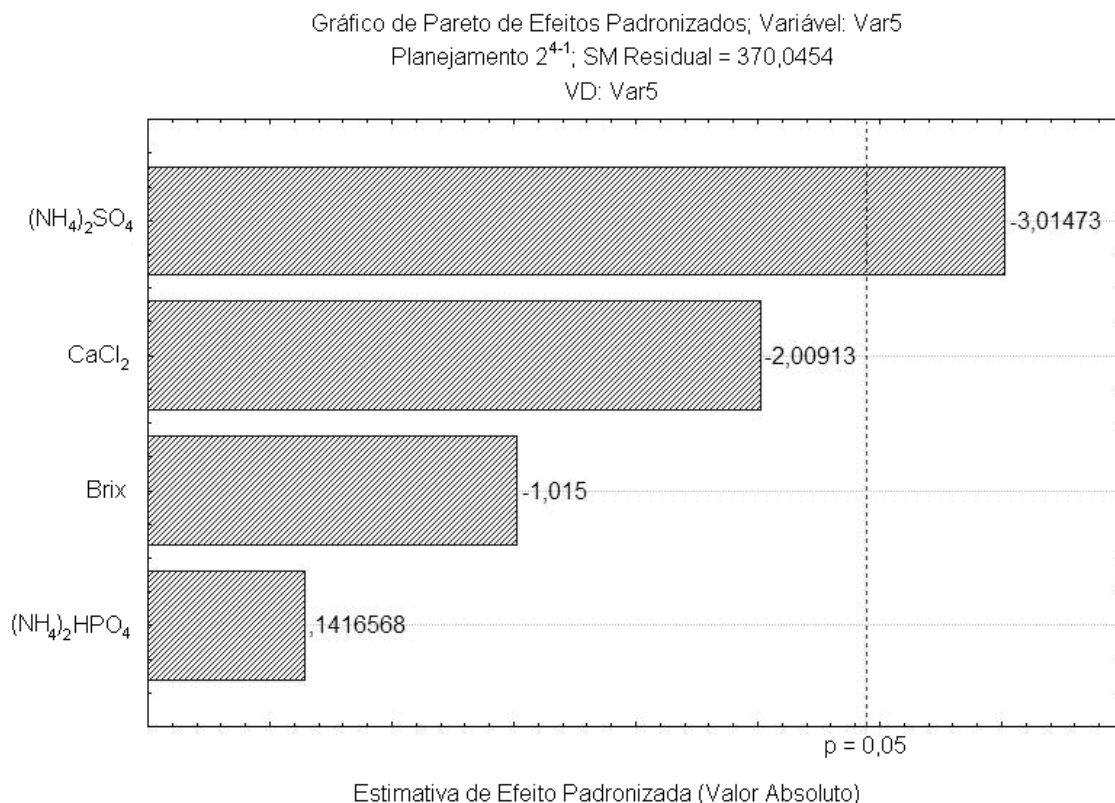


FIGURA 44 - GRÁFICO DE PARETO EM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^{4-1} – FATORES QUÍMICOS – BIOACÚMULO ($R^2 = 0,90621$)

Sendo assim, as variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e concentração de melaço ($^{\circ}\text{Brix}$) foram mantidas e suas cocntrações no meio foram estudadas na próxima etapa de otimização, de modo a se encontrar melhores resultados para as duas respostas (produção de biomassa e bioacúmulo de cobre).

Terceira etapa da otimização das condições químicas – Planejamento experimental do tipo rotacional composto central - DCCR

Nesta etapa do experimento somente dois fatores $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $^{\circ}\text{Brix}$ foram estudados em 5 níveis cada um no planejamento experimental do tipo rotacional composto central – DCCR. O planejamento do tipo 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central totalizou 11 ensaios. Os níveis estudados foram apresentados na seção 3.10.2 (otimização das variáveis químicas do processo de bioacúmulo de zinco e cobre) de Materiais e Métodos.

Os melhores resultados (Tabela 29) foram obtidos nos experimentos do ponto central. Chegou-se a uma produção de biomassa mpeida de 13,40 g/L e bioacúmulo de cobre médio de 95,03 %.

TABELA 29 - BIOACÚMULO DE COBRE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE OTIMIZAÇÃO DE FATORES QUÍMICOS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR

Experimento	Variáveis Independentes		Variáveis de Resposta	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	°BRIX	Biomassa Seca (g/L)	Bioacúmulo (%)
1	-1	-1	6,666	60,022
2	1	-1	6,106	59,558
3	-1	1	5,944	45,326
4	1	1	6,956	52,287
5	-1,41421	0	6,618	47,956
6	1,41421	0	6,050	49,658
7	0	-1,41421	6,886	58,320
8	0	1,41421	6,962	60,796
9	0	0	13,628	95,293
10	0	0	13,132	95,757
11	0	0	13,432	94,055

Os termos quadráticos dos fatores (NH₄)₂SO₄ e °Brix foram significativos no nível de 5 %. A interação entre os dois termos lineares também foi significativa. Já os termos lineares individualmente não foram significativos no nível de 5 %. Tais observações são válidas tanto para a produção de biomassa quanto para o bioacúmulo de cobre conforme as Figuras 45 e 46.

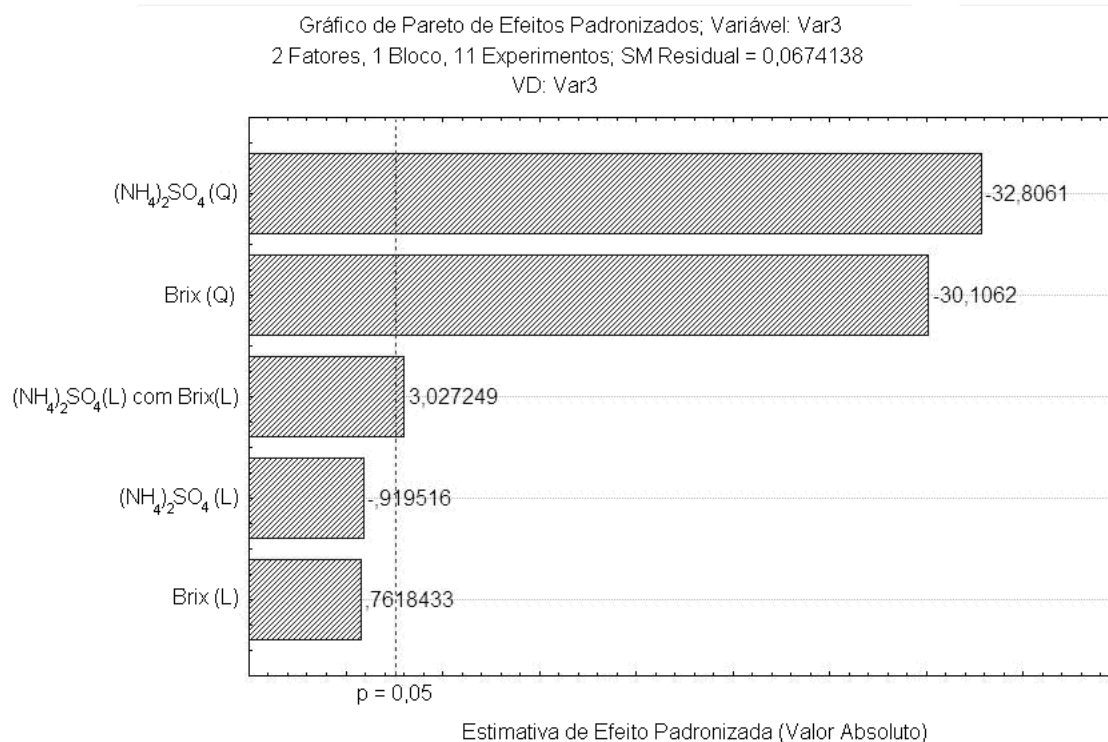


FIGURA 45 - GRÁFICO DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR

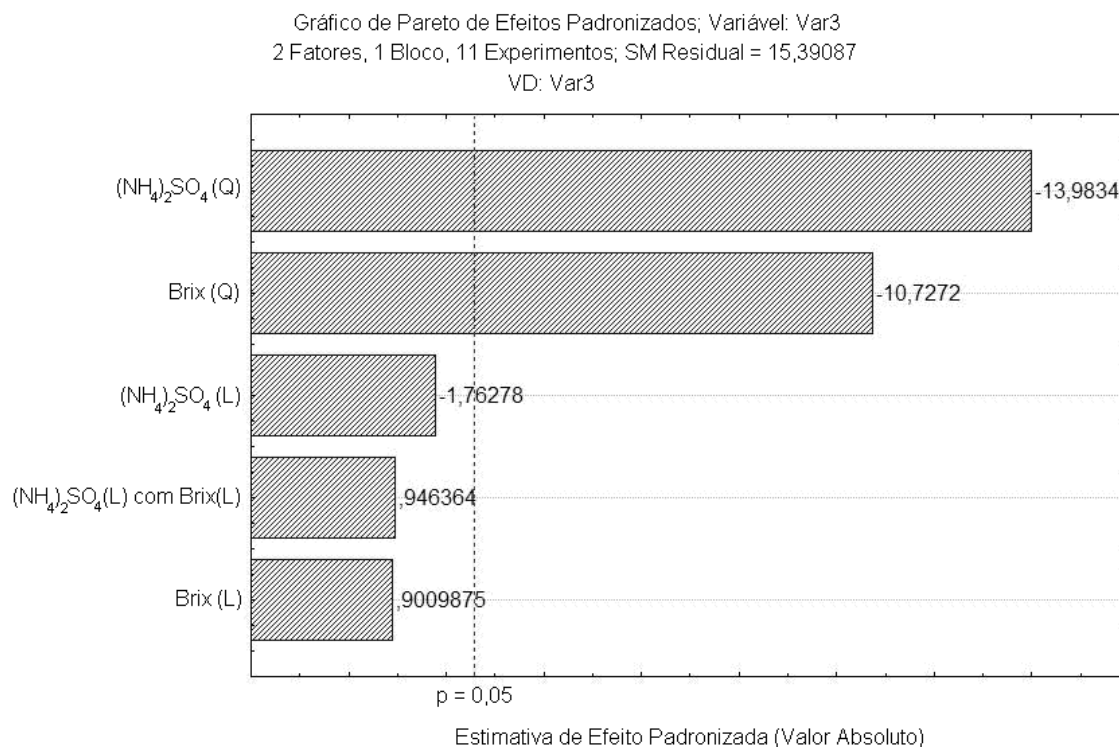


FIGURA 46 - GRÁFICO DE PARETO PARA BIOACÚMULO DE COBRE DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR

A Figura 47 demonstra que os pontos ótimos de produção de biomassa de *Candida pelliculosa* BARU05 e bioacúmulo de cobre, encontram-se em torno dos pontos centrais do planejamento (2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 7,5° Brix de concentração de melaço).

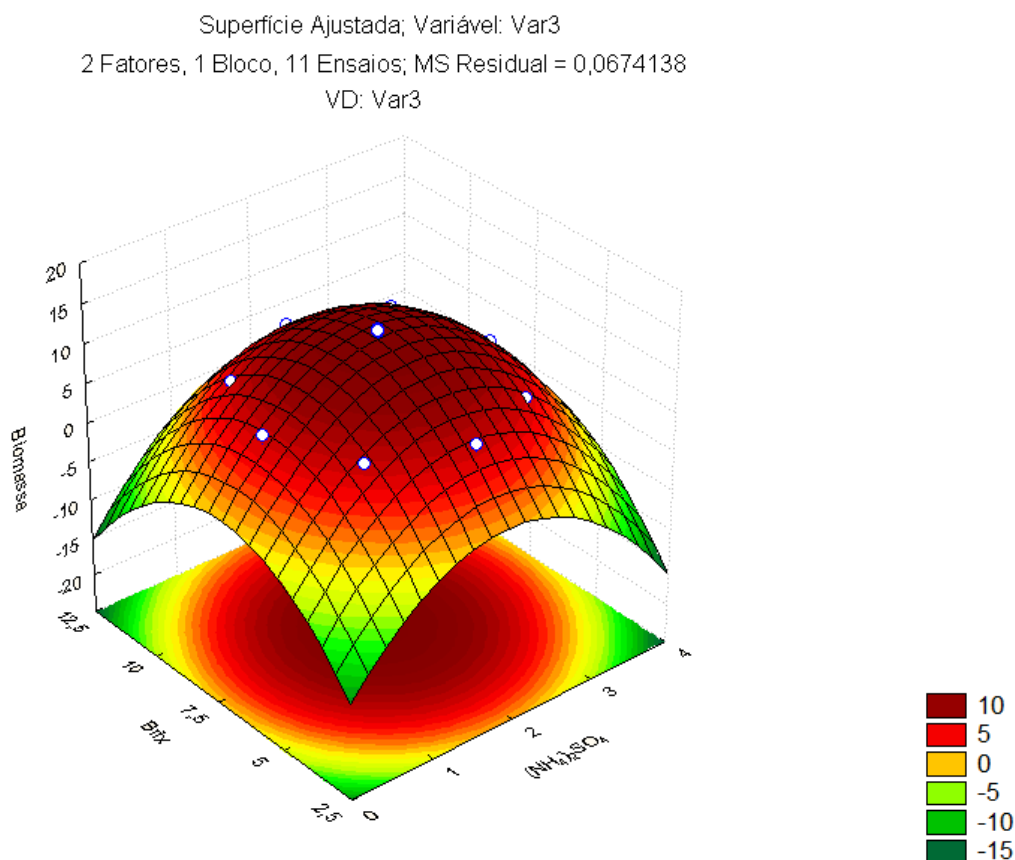


FIGURA 47 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL – DCCR

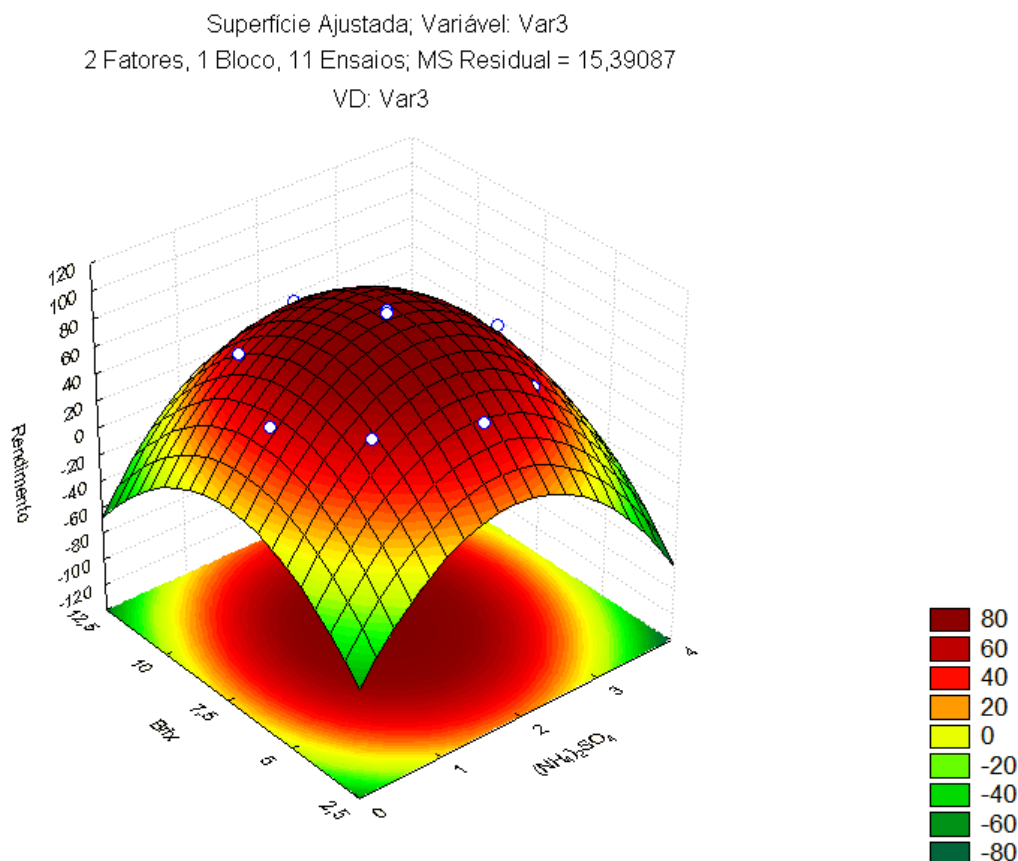


FIGURA 48 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA BIOACÚMULO DE COBRE DURANTE O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO ROTACIONAL COMPOSTO CENTRAL - DCCR

Os modelos matemáticos obtidos para as variáveis estudadas que representam a produção de biomassa e rendimento de bioacúmulo do processo estão demonstrados abaixo:

Modelo matemático de produção de biomassa

$F(x,y) = 13,39733404189 - 0,84409122624455x - 3,5844265544312x^2 + 0,069935171164964y - 3,2894250682285y^2 + 0,39300000000006xy$, onde $F(x,y)$ é a biomassa produzida (em g/L), x é o nível de $(NH_4)_2SO_4$, e y é o nível de concentração de meio (melaço).

Modelo matemático de bioacúmulo de cobre

$P(x,y) = 95.035090161863 - 2,4450375681415x - 23,085123937111x^2 + 1,2496986718974y - 17,709445209329y^2 + 1,8563494887304xy$, onde $P(x,y)$ é o rendimento (em %), x é o nível de $(NH_4)_2SO_4$, e y é o nível de concentração de meio (melaço)

Brady *et al.* (1994) relataram que uma coluna cromatográfica preenchida com a biomassa granular de *Saccharomyces cerevisiae* removeu cumulativamente até 10,6 mg g⁻¹ de cobre de uma solução com 100 mg L⁻¹. Wilhelmi e Duncan (1995), complementando o estudo, observaram que para a concentração inicial de 200 µM L⁻¹ (12,71 mg L⁻¹) a coluna com a biomassa da levedura reteve até 1,77 mg g⁻¹ de cobre. Com base nas informações citadas e nos resultados observados aqui, considera-se que a capacidade de bioissorção de cobre apresentada pela biomassa da linhagem estudada variou de compatível a superior às capacidades das biomassas de outros microrganismos. Contudo, a capacidade de bioissorção de metais pode ainda ser otimizada por alterações em fatores tais como as condições experimentais, a constituição de biomassa, tratamentos químicos e físicos, dentre outros (GADD 1993; BRADY *et al.* 1994).

Constata-se que após todo o planejamento experimental aplicado obteve-se aumento de 8,17% de rendimento de bioacúmulo e de 34,67% para biomassa, com 95,04% de rendimento de bioacúmulo e 13,397 g/L de biomassa, respectivamente, se comparados ao processo realizado antes da otimização.

Validação da otimização das condições físico-químicas do processo

Nas Tabelas 30 e 31 observa-se pelo grau de variação explicada ($R^2 \geq 0,9$) que, de acordo com a análise de teste de hipótese descrito na seção 3.10.3, não houve diferença significativa entre os resultados empíricos e teóricos, demonstrando a validação para os planejamentos experimentais de ambos os processos de bioacúmulo e produção de biomassa para cobre (presente trabalho).

TABELA 30 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS

Análise por ANOVA ($R^2 = 0,9361$)				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.00263	0.00263	0.0309 (não significativo para $p \geq 0.05$)
Resíduo	2	0.17053	0.08526	
Total	3	0.17316		

Legenda: FV – fonte de variação; GL – grau de liberdade; SQ – soma de quadrado; QM – quadrado médio.

TABELA 31 - RESULTADO DA ANÁLISE POR ANOVA PARA VALIDAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO OBTIDO PARA BIOACÚMULO DE COBRE NA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS

Análise por ANOVA ($R^2 = 0,9865$)				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.00239	0.00239	0.0649 (não significativo para $p \geq 0.05$)
Resíduo	2	0.07373	0.03686	
Total	3	0.07612		

Legenda: FV – fonte de variação; GL – grau de liberdade; SQ – soma de quadrado; QM – quadrado médio.

Os modelos matemáticos demonstrados na seção anterior são importantes, pois Rodrigues e Iemma (2005) afirmam que validam os processos utilizados nos planejamentos experimentais.

Por fim, demonstra-se que as condições físicas ótimas para o processo de bioacúmulo e produção de biomassa são: pH 6, taxa de inóculo de 7,5 %, 30 °C. As melhores condições químicas são: a concentração de 10°Brix de melaço de cana suplementado com 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

4.7 CINÉTICA DA PRODUÇÃO RICA EM MICRONUTRIENTES NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FRASCOS DE *ERLENMEYER*

4.7.1 Cinética da produção de biomassa rica em zinco

Nas Figuras 49 e 50 observa-se a cinética da biomassa produzida com bioacúmulo de zinco nas condições otimizadas. A cepa *Candida pelliculosa* BARU05 produziu 11,99 g/L de biomassa com um bioacúmulo de 96,17 % após 72 horas de fermentação. A concentração de açúcares totais e redutores no meio reduziu-se a 0,601 e 2,607 g/L no mesmo período, respectivamente, mostrando que houve um bom consumo das fontes de carbono. Stehlik-Tomas *et al.* (2004) confirmam que é importante acompanhar o consumo das fontes de carbono num bioprocessamento para bioacumulação de micronutrientes.

A velocidade específica de crescimento celular e de bioacúmulo foi de $0,0136 \text{ h}^{-1}$ e $0,0252 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (parâmetros: biomassa produzida e zinco bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17).

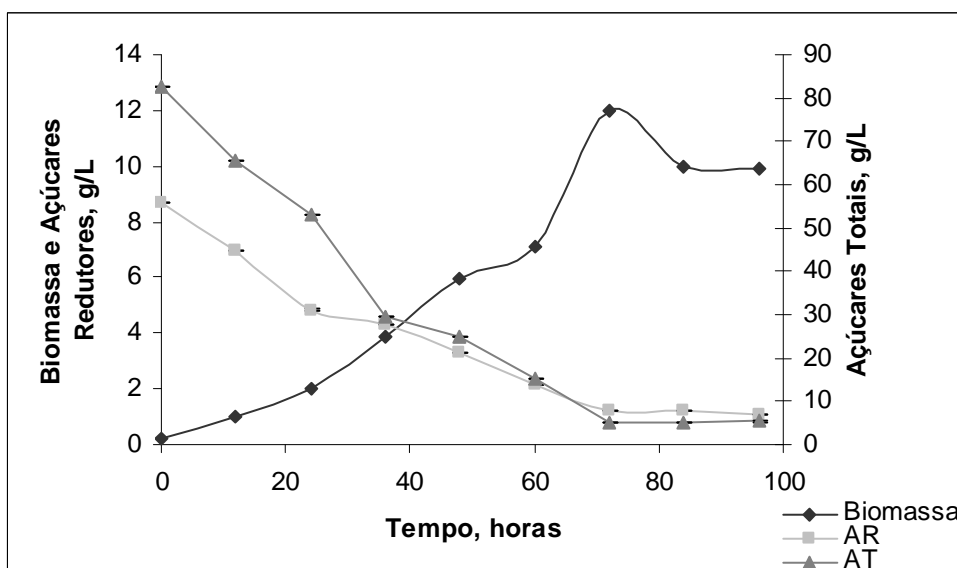


FIGURA 49 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

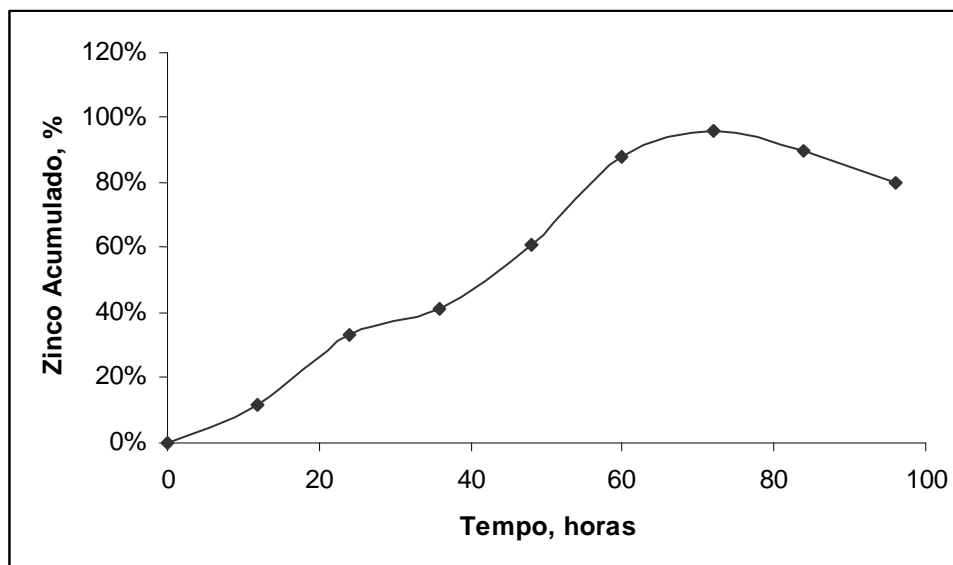


FIGURA 50 - BIOACÚMULO DE ZINCO EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE ZINCO APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

4.7.2 Cinética de produção de biomassa rica em cobre

Nas Figuras 51 e 52 observa-se a cinética de produção de biomassa e bioacúmulo de cobre nas condições otimizadas. A cepa *Candida pelliculosa* BARU05 produziu 13 g/L de biomassa com bioacúmulo de 98,32% após 72 horas de fermentação. A concentração de açúcares, totais e redutores, diminuiu a 0,601 e 2,622 g/L no mesmo período, respectivamente, mostrando que a cepa foi capaz de consumir o substrato de maneira eficaz.

A velocidade específica de crescimento celular e de bioacúmulo foi de $0,0136 \text{ h}^{-1}$ e $0,0266 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (parâmetros: biomassa produzida e cobre bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17).

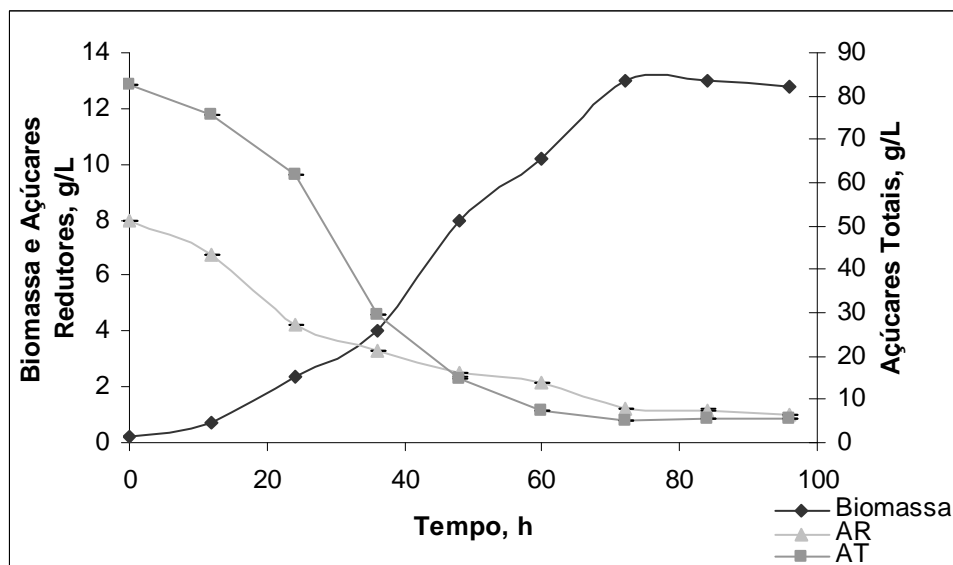


FIGURA 51 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

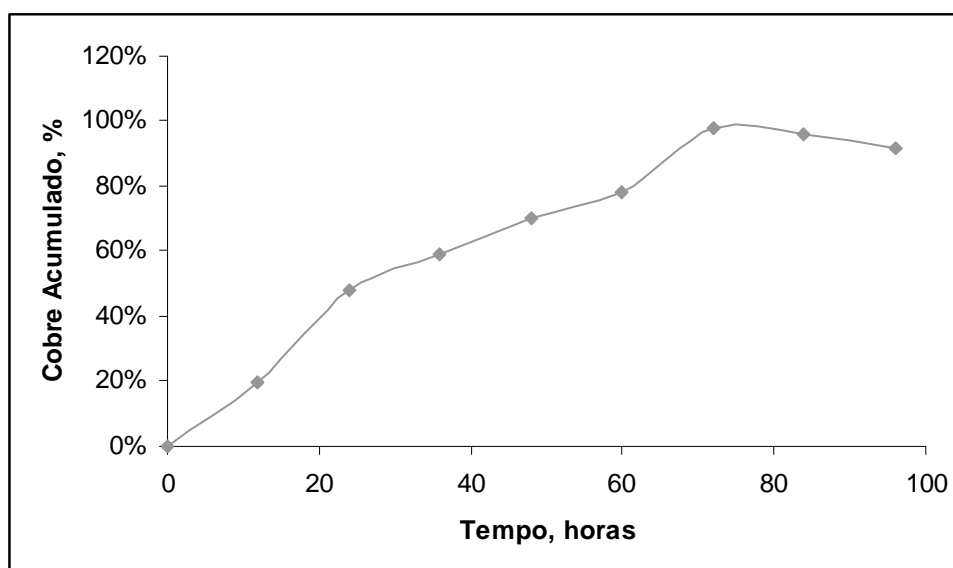


FIGURA 52 - BIOACÚMULO DE COBRE EM CINÉTICA DE BIOACÚMULO DE COBRE APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Gönem e Aksu (2008) detalham que o processo fermentativo realizado em biorreatores tem que passar por um planejamento experimental antes, para que possa baratear o custo do processo, tornando-o economicamente mais viável. Porém, os mesmos afirmam que por ser tratar o cobre, um elemento traço, a produção que eles obtiveram de bioacumulação

em 34,2 % (rendimento) com a produção de biomassa em 50 mg/L foi satisfatório para sua pesquisa.

4.8 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES EM BIORREATOR DO TIPO STR – BATELADA

Um estudo da cinética de produção de biomassa com bioacúmulo de zinco e cobre foi conduzido em biorreator em operação em batelada.

Rahoka *et al.* (2006) descrevem que o processo de batelada no biorreator é importante para conhecer o comportamento do microrganismo em seu desenvolvimento e produção do produto de interesse. Contudo, ressaltam que a aeração é primordial se for de interesse de se obter uma boa quantidade de biomassa de levedura.

4.8.1 Produção de biomassa rica em zinco

As Figuras 53 e 54 apresentam a evolução da produção de biomassa da cepa *Candida pelliculosa* BARU05 em reator de batelada atingindo um rendimento de 90,53% e 36,33 g/L de biomassa seca em 24 horas de fermentação. Dessa forma, o processo validado acima se destaca como de extrema importância, pois ao ser escalonado, o processo torna-se ainda mais viável, visto que atingiu-se o pico de produção de biomassa e bioacúmulo de zinco em apenas 24 horas de fermentação. Tal fato se deve certamente a influência de um melhor controle das variáveis do processo no biorreator (pH, temperatura), mas principalmente a uma aeração mais intensa, o que estimula o crescimento.

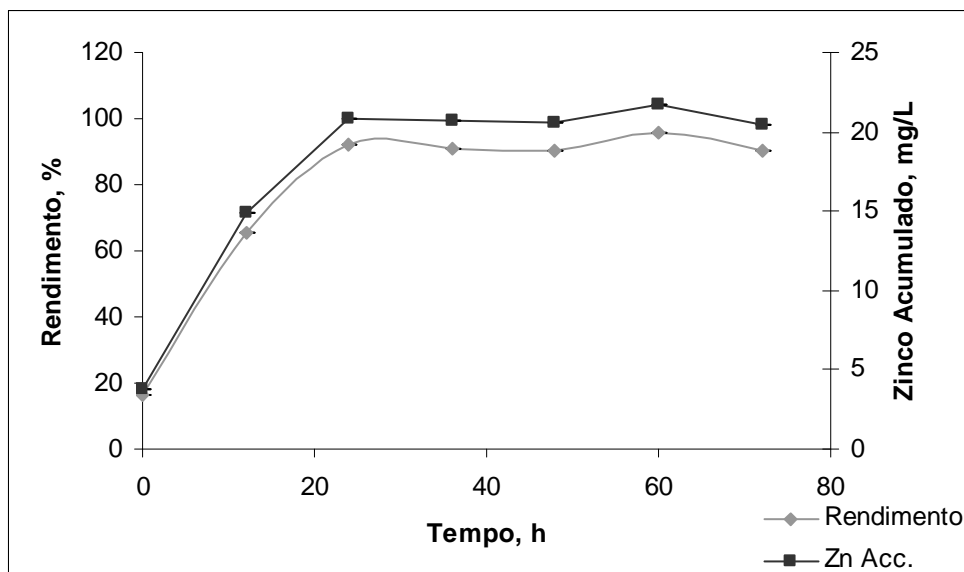


FIGURA 53 - ZINCO ACUMULADO (Zn Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – ZINCO

Na Figura 53, observa-se que de início houve rendimento de 16,39 % de zinco bioacumulado. Isso confirma que houve uma adsorção do metal na membrana da levedura (MAPOPELO *et al.*, 2005).

Outro ponto importante observado na Figura 54 é que o consumo de açúcares redutores foi de 92,6 % e de açúcares totais foi de 97,32 %. Tal fato demonstra que o substrato foi consumido de maneira eficiente. Pode-se ainda sugerir, como maneira de aumentar a produção de biomassa, a operação em batelada alimentada.

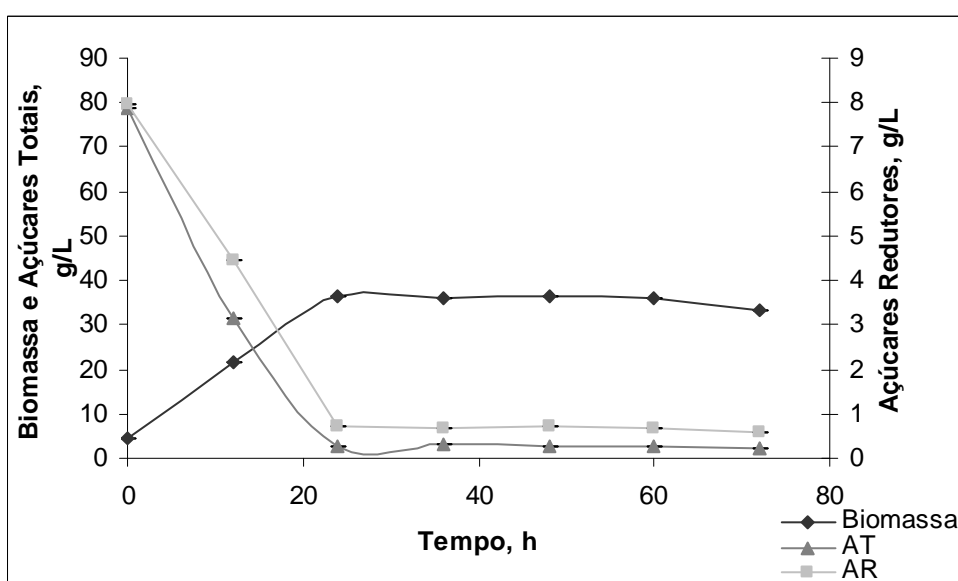


FIGURA 54 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – ZINCO

Nesse processo, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $0,0182 \text{ h}^{-1}$ e $0,0096 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (parâmetros: biomassa produzida e zinco bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17).

Roepcke (2007) constatou que a cepa de levedura *Komagataella (Pichia) pastoris* NRRL Y1603 apresentou um comportamento bastante peculiar: ela não foi capaz de metabolizar todos os açúcares presentes no meio de cultivo, consumindo apenas cerca de 30% dos açúcares disponíveis. Isto pode ser justificado pelo fato de esta espécie não possuir a habilidade de consumir o açúcar sacarose, consumindo apenas a glicose presente no meio de cultivo nos testes realizados (KURZMAN; FELL, 1998). No experimento de Roepcke (2007) o crescimento celular foi influenciado pelo baixo consumo de açúcares presentes no meio do microrganismo: a maior concentração de biomassa produzida por esta levedura foi de 7,72 g/L, no tempo de 120 horas, em um meio com concentração de 0,05 g/L de ZnSO_4 .

4.8.2 Produção de biomassa rica em cobre

As Figuras 55 e 56 apresentam a cinética de produção de biomassa rica em cobre em biorreator de batelada. A produção de biomassa atingiu 38,85 g/L e um rendimento de 91,98 % em 60 horas de fermentação. O aumento de 190 % de produção no biorreator se deve ao melhor controle das variáveis do processo e, principalmente devido à aeração mais intensa o que estimulou o crescimento. Nessa mesma assertiva, Rajoka *et al.* (2006) confirmam a importância da aeração intensa (30% de oxigênio dissolvido) para o aumento da produção de biomassa.

Assim como no processo de zinco, observa-se na Figura 55 houve rendimento de 70,37 % de cobre bioacumulado, novamente confirmando o fenômeno de adsorção do metal na membrana da levedura (MAPOPELO *et al.*, 2005).

Contudo, recomenda-se a operação em batelada alimentada como forma de aumentar a produção e bioacúmulo de cobre.

Nesse processo, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $0,01465 \text{ h}^{-1}$ e $0,0023 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (parâmetros: biomassa produzida e cobre bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17).

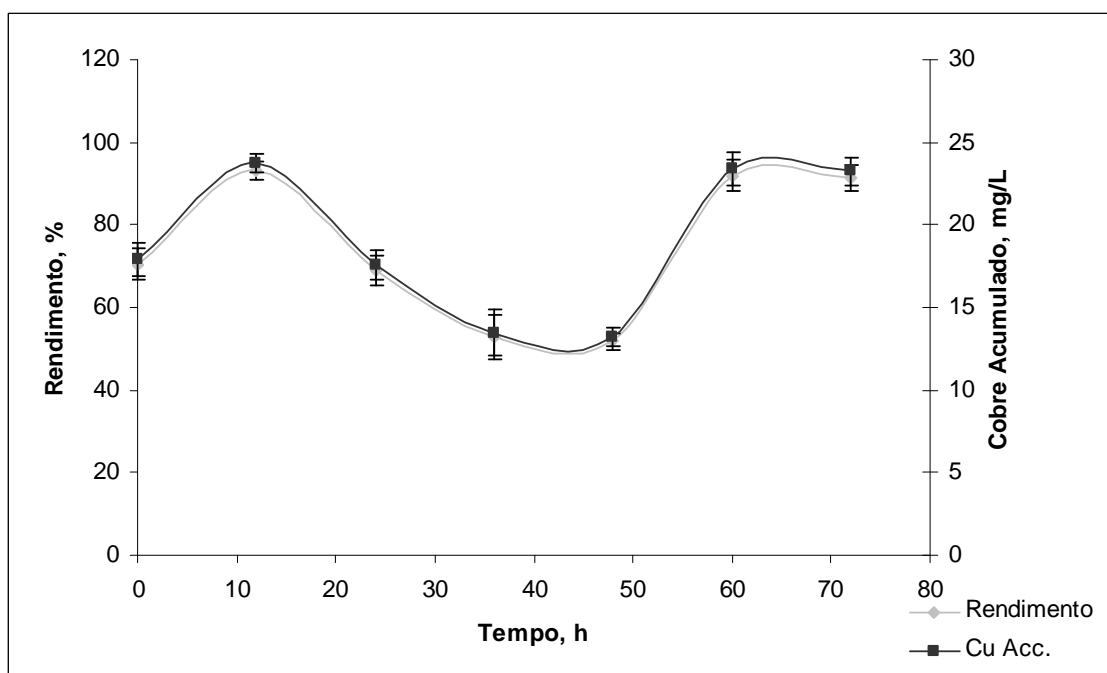


FIGURA 55 - COBRE ACUMULADO (Cu Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA – COBRE

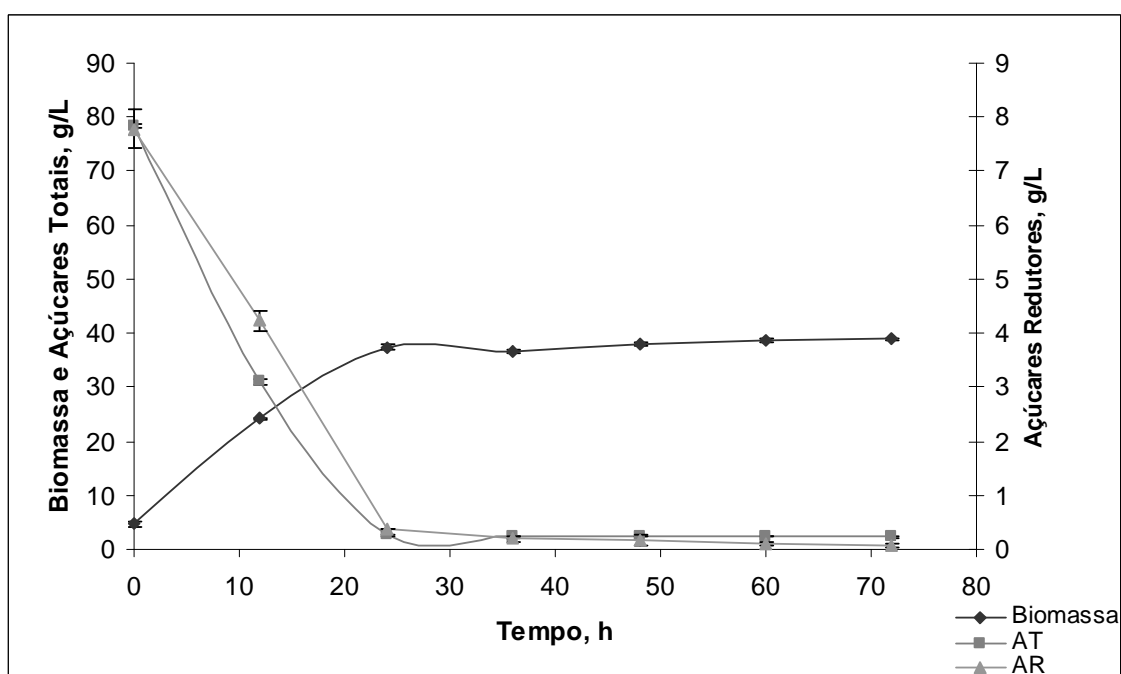


FIGURA 56 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA

4.9 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM MICRONUTRIENTES EM BIORREATOR DO TIPO STR – BATELADA ALIMENTADA

4.9.1 Produção de biomassa rica em zinco

De acordo com as Figuras 57 e 58, a cepa BARU05 produziu 58,43 g/L de biomassa e acumulou 22,73 mg/L (100%) de zinco. O consumo de açúcares foi de 88,2% e 84,09% de açúcares redutores e totais, respectivamente, após 48 h de fermentação. Os resultados foram superiores aos apresentados nas literaturas (2,924 mg/L de zinco bioacumulado e 30 g/L de biomassa produzida por *Picchia guilliermondii* (ROEPCKE, 2007); 1,4% de rendimento de zinco por *Saccharomyces cerevisiae* (STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004); 34,4 g/L de biomassa em fermentação do tipo batelada-alimentada por *Candida utilis* (LEE; KIM, 2001).

Nesse processo, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $1,935 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $3,05 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (parâmetros: biomassa produzida e zinco bioacumulado em 0h e 72h; ver seção 3.17).

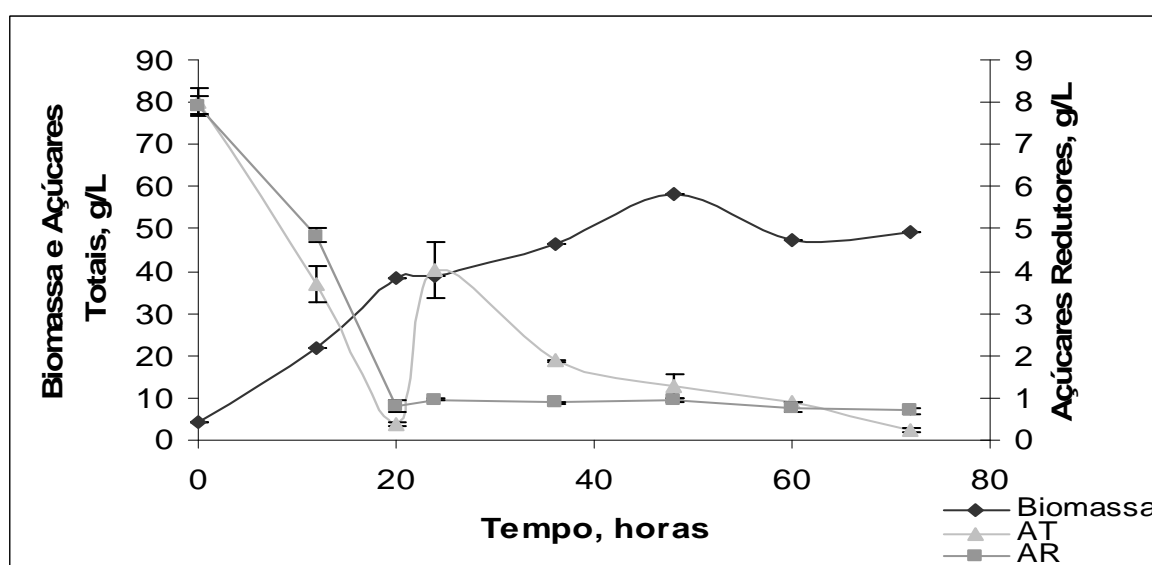


FIGURA 57 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA

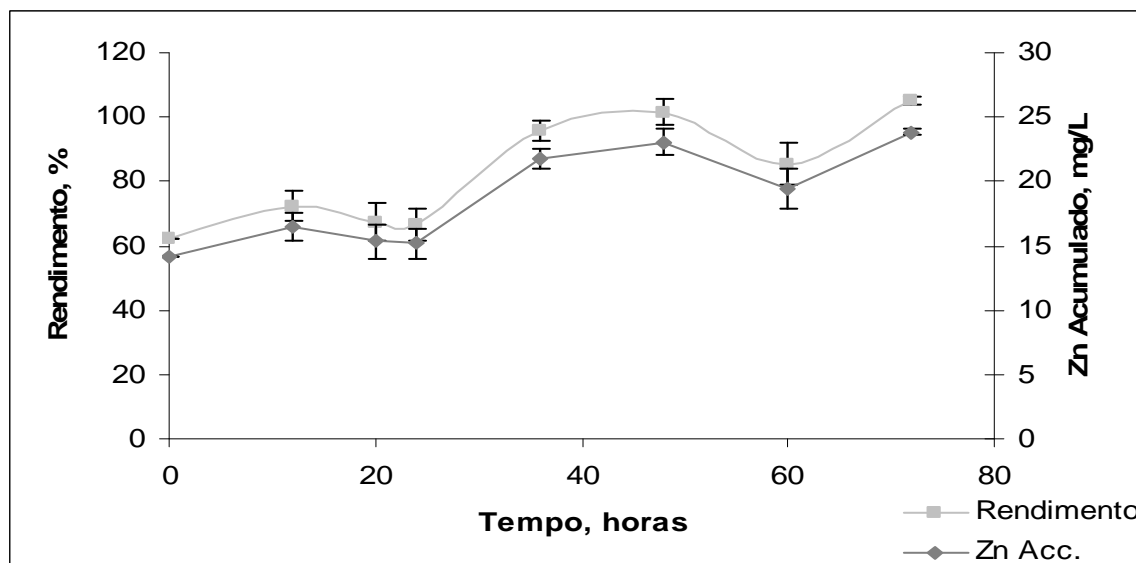


FIGURA 58 - ZINCO ACUMULADO (Zn Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA

4.9.2 Produção de biomassa rica em cobre

A Figura 60 apresenta a cinética de produção de biomassa com bioacúmulo de cobre em batelada alimentada. A produção de biomassa atingiu 57,54 g/L e o rendimento de bioacúmulo chegou a 100 %.

Além disso, altas concentrações de biomassa representam altas concentrações de proteína. Neste caso foi determinado que a biomassa possui 49 % de proteínas. Menezes e Salles (1976) obtiveram 48,6 % sendo um resultado comparável ao do presente trabalho.

Nesse processo, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $0,0153 \text{ h}^{-1}$ e $0,0048 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

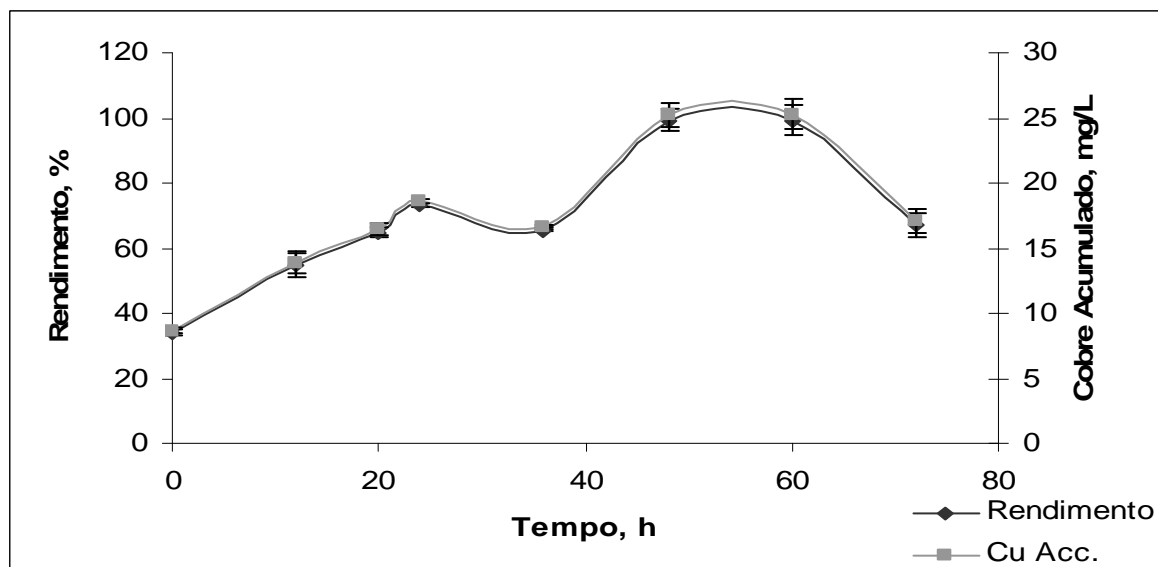


FIGURA 59 - COBRE ACUMULADO (Cu Acc.) E RENDIMENTO DE BIOACÚMULO EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA

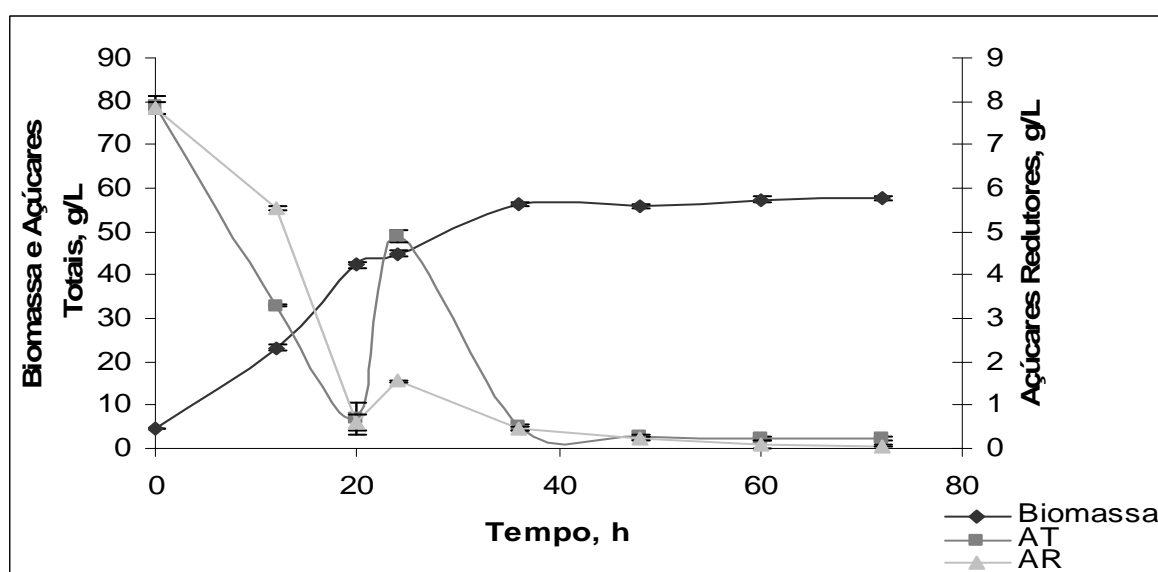


FIGURA 60 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E REDUTORES (AR) EM CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO TIPO BATELADA-ALIMENTADA

Comparando com Lee e Kim (2001), a produção de biomassa nesse trabalho foi 67,02% mais eficiente no processo fermentativo.

A Tabela 32 demonstra, resumidamente, todos os resultados obtidos desde a etapa de seleção da melhor cepa bioacumuladora e produtora de biomassa até o escalonamento final em biorreator em batelada alimentada.

TABELA 32 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM CADA ETAPA DO PROCESSO FERMENTATIVO

Etapa	Rendimento (%)	Biomassa (g/L)	Bioacumulado (mg/Kg)
Seleção (Soja; Zn ⁺²)	83,61	4,26	4460,09
Seleção (Cana; Zn ⁺²)	88,69	9,93	2035,06
Seleção (Cana; Cu ⁺²)	87,86	9,95	2251,71
Otimização Final (Zn ⁺²)	90,10	12,41	1650,77
Otimização Final (Cu ⁺²)	95,04	13,40	1805,36
Biorreator Batelada (Zn ⁺²)	90,53	36,33	566,40
Biorreator Batelada (Cu ⁺²)	91,98	38,85	602,55
Biorreator Batelada-Alimentada (Zn ⁺²)	100,00	58,43	389,01
Biorreator, Batelada-Alimentada (Cu ⁺²)	100,00	57,54	442,30

Um dos requisitos de qualidade na especificação da levedura seca para ração animal é a percentagem de proteína bruta mínima (35 a 40 %) segundo Leimer (2005). Sendo assim, a biomassa seca produzida pela cepa *Candida pelliculosa* BARU05 demonstrou estar dentro dos requisitos de qualidade.

O processo desenvolvido para a biomassa rica em cobre ou zinco pela cepa BARU05 apresenta uma série de vantagens incluindo o custo da matéria-prima que é um resíduo agroindustrial produzido em abundância no país, o melaço de cana.

O uso de resíduos agro-industriais como melaço de soja, melaço de cana, vinhaça de soja, dentre outros, em fermentação auxilia o desenvolvimento de um processo ecologicamente correto e atrativo em termos de custo-benefício (RUBEL, 2006).

Bekatorou *et al.* (2006) afirmam que *Candida utilis*, também conhecida como levedura *Torula*, têm sido usada comercialmente por mais de 60 anos como suplemento nutricional em ração animal. Uma vez que a cepa isolada *Candida pelliculosa* é adaptada para crescer em um importante resíduo industrial (melaço de cana), ela tem grande potencial para ser usada como aditivo com acúmulo de cobre e zinco, além de outros microelementos.

De acordo com Khan (1990), no Paquistão, o custo de ração calculado da ração padrão (composta por soja, A), com 25% de substituição por produto fermentado (B) e 50% de substituição por produto fermentado (C) foi \$3,77, \$3,42 e \$3,12/100 kg de saca, respectivamente. Isso mostra que a substituição por 25% ou 50% da ração padrão por SCP irá reduzir o custo da ração aviária por saca (100 kg) em \$0,35 e \$0,65, respectivamente. Isso irá prover um grande alívio para os avicultores derrubando o preço dos produtos. O mesmo autor

ainda retrata que muitas biomassas de origem microbiana são enriquecidas com microelementos, devido ao fato de ser adicionado no processo, uma enzima capaz de complexar, tornando um potencial aditivo de ração animal.

Lee e Kim (2001) estimaram o custo de produção baseado no preço dos substratos para o cultivo de *C. utilis*. O cultivo de *C. utilis* usando produtos químicos para uso industrial ao invés de produtos químicos para cultura celular resultou em redução substancial de custos de produção. A fermentação em batelada-alimentada foi encontrada como sendo o melhor tipo de cultura para produção de biomassa de *C. utilis* quando tanto o rendimento de biomassa quanto a produtividade foram consideradas. O custo total de produção de *C. utilis* cultivada em fermentação do tipo batelada-alimentada foi estimado em US\$2,76 por kg de biomassa seca. O custo de produção é favoravelmente comparável com o preço de venda de produtos de leveduras comerciais, Saf Instant Yeast (*S. cerevisiae* e aditivos). Conseqüentemente a produção de *C. utilis* em fermentação do tipo batelada-alimentada com estratégia de alimentação sigmoidal é uma aproximação viável para produção em massa de SCP.

5 CONCLUSÕES

As análises físico-químicas da polpa do Baru (*Dipteryx alata*) permitiram obter uma microflora com elevado potencial biotecnológico.

Dentre as 11 cepas isoladas, uma delas (BARU05, identificada pelo kit Api como *Candida lusitaniae* ou 100% de identificação molecular, para *Candida pelliculosa*), demonstrou grande capacidade de adaptação para crescimento em melaço de cana, enriquecido de zinco ou cobre, além da alta capacidade de assimilação desses micronutrientes em sua biomassa.

As onze leveduras isoladas desenvolveram-se melhor em melaço de cana em relação ao melaço de soja, tanto em termos de biomassa produzida, quanto em acúmulo de micronutrientes. No entanto, a cepa *Candida pelliculosa* BARU05 destacou-se por sua capacidade de produzir biomassa e bioacumular zinco e cobre.

A cinética realizada após a seleção do melhor substrato, juntamente com a melhor linhagem bioacumuladora de microelementos (BARU05) permitiu o conhecimento do melhor tempo que foi em 72 horas para o cobre e zinco.

A otimização do processo na escala laboratorial foi fundamental, uma vez que a etapa seguinte (biorreator) exigia um conhecimento prévio da cepa isolada, no que concernem fatores físicos e químicos ótimos, para o seu desenvolvimento e bioacumulação. As condições ótimas definidas para o processo de bioacúmulo de zinco e produção de biomassa foram: otimização física: pH 4, taxa de inóculo de 5 %, 28 °C. As condições ótimas dos fatores químicos foram definidas como: concentração de 10 °Brix de melaço de cana, com 3 g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e 0,1 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.

As condições ótimas de otimização física para o processo de bioacúmulo e produção de biomassa do cobre foram: pH 6, taxa de inóculo de 7,5 %, 30 °C. Para as condições ótimas dos fatores químicos tem-se: concentração de 10°Brix de melaço de cana, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

A fermentação final (validação do último planejamento experimental) para o zinco na cepa *Candida pelliculosa* BARU05 produziu 11,99 g/L de biomassa com um bioacúmulo de 96,17 %. Após 72 horas de fermentação, a concentração de açúcares totais e redutores no meio reduziu-se a 0,601 e 2,607 g/L no mesmo período, respectivamente, mostrando que houve um bom consumo das fontes de carbono. A velocidade específica de crescimento celular e de bioacúmulo foi de $0,0136 \text{ h}^{-1}$ e $0,0252 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Para o processo de bioacúmulo de cobre a cepa *Candida pelliculosa* BARU05 produziu 13 g/L de bioamassa com bioacúmulo de 98,32% após 72 horas de fermentação. A concentração de açúcares, totais e redutores, diminuiu a 0,601 e 2,622 g/L no mesmo período, respectivamente, mostrando que a cepa foi capaz de consumir o substrato de maneira eficaz. A velocidade específica de crescimento celular e de bioacúmulo foi de $0,0136 \text{ h}^{-1}$ e $0,0266 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

O teste de zinco para o biorreator de batelada atingiu um rendimento de 90,53% e 36,33 g/L de biomassa seca em 24 horas de fermentação. Dessa forma, o processo validado acima se destaca como de extrema importância, pois ao ser escalonado, o processo torna-se ainda mais viável, visto que atingiu-se o pico de produção de biomassa e bioacúmulo de zinco em apenas 24 horas de fermentação.

Para o processo em biorreator num processo de batelada o bioacúmulo de cobre a produção de biomassa atingiu 38,85 g/L e um rendimento de 91,98 % em 60 horas de fermentação o aumento de produção do cobre em 190 % no biorreator se deve ao melhor controle das variáveis do processo e, principalmente devido à aeração mais intensa o que estimulou o crescimento.

Para a fermentação em batelada alimentada de zinco obteve-se 58,43 g/L de biomassa e acumulou 22,73 mg/L (100%) de zinco, e consumiu 88,2% e 84,09% de açúcares redutores e totais, respectivamente, após 48h de fermentação. Nesse processo, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $0,019 \text{ h}^{-1}$ e $0,003 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

O teste de cobre para a batelada-alimentada obteve 57,54 g/L de biomassa e 100% de rendimento para o bioacúmulo de cobre. O consumo de açúcares foi de 99,35% para os açúcares redutores e 97,22% para os açúcares totais. Em se tratando de açúcar residual, isso demonstra que não houve perda ou desperdício no processo fermentativo. Também, as velocidades específicas de crescimento microbiano e de bioacúmulo foram $0,015 \text{ h}^{-1}$ e $0,0048 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Existem boas perspectivas da utilização da cepa BARU05 como suplemento enriquecido para ração animal, considerando as conclusões anteriormente citadas e a redução do impacto ambiental e de custos que a utilização do melaço de cana como substrato em fermentação líquida proporciona. Cabe uma ressalva que a análise de proteínas para biomassa seca obtida tanto para o zinco quanto para o cobre, foi determinado 49 % de proteínas já que a especificação de levedura seca para ração animal possui como requisitos de qualidade proteína bruta mínima (35 a 40%) (LEIMER, 2005).

O consumo de açúcares foi eficaz, porque isso evita contaminação ambiental, e indica o melaço como um meio favorável para fermentação e produção de biomassa enriquecida de cobre ou zinco.

O processo de produção de biomassa rica em zinco e/ou cobre se mostrou bastante promissor com a produção de significativas concentrações de biomassa com acúmulo dos referidos micronutrientes.

6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes sugestões para trabalhos futuros, perspectivas principalmente para a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco ou cobre, deverão complementar a investigação iniciada com esta tese:

- Testar a mesma linhagem isolada *Candida pelliculosa* BARU05 quanto à sua capacidade em bioacumular outros micronutrientes;
- Testar outros resíduos agro-industriais com as 11 linhagens isoladas;
- Realizar outros testes com as 11 leveduras, para produção de vitaminas, ácidos orgânicos ou atividades antimicrobianas e antifúngicas;
- Testar a biomassa rica em microelementos em animais (aves ou mamíferos) acompanhando o ganho de peso e dosagem sanguínea, avaliação biológicas;
- Analisar os níveis de toxicidade no preparo das rações com essa biomassa enriquecida.
- Realizar o melhoramento genético da BARU05 (*C. pelliculosa*), para tentar aumentar a biomassa ou outros produtos de interesse industrial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOV, Sh. A.; EFENDIEVA, D. A.; KOTENKO, S. T. S. Effect of the growth medium on protein content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 30, p. 225-227, 1994.
- AGATE, A. D. Bioremediation and biobeneficiation of metals. In: ROUSSOS, S. **New horizons in biotechnology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 215-220.
- AHEARN, D. G.; ROTH, F. J.; MEYERS, S. P. Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. **Marine Biology**, v. 1, p. 291-308, 1968.
- AHUJA, P.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Zn^{2+} biosorption by *Oscillatoria angustissima*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.
- AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption performace of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**, v. 18, n. 11, p. 1099-1109, 2005.
- ALHO, C. J. R.; MARTINS, E. S. **De grão em grão, o cerrado perde espaço: cerrado – impactos do processo de ocupação**. Brasília, WWF – Fundo Mundial para a Natureza, 1995.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. R. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington, 1997.
- APARICIO, S. **Chromium biosorption by the algal biomass *Sargassum* sp.** 45 f. Dissertation (Master of Science Programme) – Department of Kemi och Metallurgi, Division of Kemisk Teknologi, Luleå University of Technology, Sweden, 2000.
- ARAKAKI, A. H. **Potencialidade do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) para o desenvolvimento rural em fragmentos do cerrado no assentamento Andalúcia/MS**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2004.
- ASHCAR, H.; PAULA, C. R.; PETROCINI, V. R. Manutenção de fungos por processo de liofilização após período prolongado de tempo – 34 anos. **Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 422-424, 1988.
- BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potencial bacterial agent. **Journal Clinical Investigation**, v.52, p.741-744, 1973.
- BAIK, W. Y.; BAE, J. H.; CHO, K. M.; HARTMEIER, W. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. **Biosource Technology**, v. 81, p. 167-170, 2002.

BAKALLI, I.R.; PESTI, G.M.; RAGLAND, W.L. Dietary copper in excess of nutritional requirement reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poultry Science**, v.74, p.360-365, 1995.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. **Processos de produção de álcool**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. cap. 4, p.38-85.

BEHR, T. Von; NASSER, L. C. B. **A flora do planalto central do Brasil**. Brasília, DF: Paralelo 15, 1999. 184 p.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.

BERWANGER, A. L. Da S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 177-183, 2007.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001.

BOKHARI, S. A. I.; FAROOQ, L.; RAJOKA, M. I. Cinética de alto nível da produção de β -glucosidase por um 2-deoxiglucose mutante resistente de *Humicola lanuginosa* em fermentação submersa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 724-733, 2008.

BOLTON, H.; GORBY, Y. A. An overview of the bioremediation of metal-contaminated industrial effluents using waste sludges. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 9–15, 1995.

BORUN, Z.; XUENA, G.; XIUHUI, F. **High-biomass zinc-riched yeast, breeding method and use thereof**. Patente: CN1313596, 2010.

BORZANI, W.; FALCONE, M. **Curso de bioquímica industrial: fundamentos**. v. 1. São Paulo, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1960.

BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 149-159, 1994.

BRADY, D.; STOLL, A.; DUNCAN, J. R. Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass. **Environmental Technology**, v. 15, p. 429-438, 1994.

BRAVO. C. E. C.; de CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 137-152, 2000.

CANDIL, R. F. M. **Cumbaru** (*Dipteryx alata* Vog.): uma forma alimentar e de renda à comunidade do assentamento Andalúcia – Nioaque/MS. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, 2004.

CARMO DE SOUZA, L. Distribution of yeasts in natura. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.) **The yeasts: biology of the yeasts**. v. 10. London: Academy Press, 1969. p.106.

CARVALHO FILHO, M. A. S. **Preparação e estudo termooanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto (escandio), no estado sólido**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

CAZETTA, M. L., CELLIGOI, M. A. P. C., BUZATO, J. B., SCARMINO, I. S. Fermentations of molasses by *Zymomonas mobilis*: effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2824-2828, 2007.

CEGLA, U. G.; SHUSTER, M. **Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof**. US Patent 6.913.771, Jul. 5, 2005.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 302-307, 1997.

CORRÊA, G. C. **Avaliação comportamental de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nos cerrados do Estado de Goiás**. 111 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

CRUIKSHANK, M.; PERRIN, L. Pathological function of phenolics compounds in plants. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **Biochemistry of phenolic compounds**. London: Academic Press, 1964. p. 511-544.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 166-168, 2002.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. Bioaccumulation of cooper (II) and nichkel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* spp. **Water Research**, v. 35, n. 6, p. 1425-1434, 2001.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of cooper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 135-142, 1999.

DORAN, P M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, 1997.

DOYLE, M. O.; OTTE, M. L. Organism-induced accumulation of iron, zine and arsenic in wetland soils. **Environmental Pollution**, v. 96, p. 1-11, 1997.

EATON, A. D.; CLESSERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. New York, Washington: American Public Health Association, 1995.

ECCLES, H. Removal of heavy metals from effluent streams – why select a biological process? **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 35, p. 5-16, 1995.

EGLI, C. M.; HENICK-KLING, T. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 241-247, 2001.

EIDE, D. Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 573-577, 1997.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M. N. (Coord.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Universidade de Brasília/SEMATEC, 1990. p. 9-65.

ENGL, A.; KUNZ, B. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of nutrient conditions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 63, p. 257-261, 1995.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8 S rRNA gene and the two ribosomal internal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. Cidade: Edgard Blücher L.T.D.A., 1989.

FARIAS, Y. P.-T. M. M.; LEMOS, J. L. S. Aplicação de microrganismos na remediação de áreas contaminadas por metais pesados. In: XVI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008. Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2008.

FELL, J. W. Distribution of yeasts in the water masses of the southern oceans. In: COLWELL, R. R.; MORITA, R. Y. (Eds.). **Effects of the ocean environments on microbial activities**. Baltimore: University Park Press, 1974. p. 510-523.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática**. Tese (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

FERREIRA, E. M. F. C. **Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, Braga, 1995.

FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cernargen, 1998. p. 220.

FLORENTINO, H. de O., MORENO, E. V., SARTORI, M. M. P. Multiobjective optimization of economic balances of sugarcane harvest biomass. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 561-564, 2008.

FREITAS, R. J. S.; DAHLER, A. L. K.; SANTOS, M. A. B.; TIBONI, E.; CECATO, E. **Técnicas analíticas de alimentos**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), 1979. 114 p. Apostila.

FRIEND, G. Biochemistry of plant phenolic. In: SWAIN, T.; HARBORNE, J. B.; VAN SUMERE, C. F. (Eds.). **Recent advances in phytochemistry**, v. 12. New York: Plenum Press, 1979. p. 557-588.

FUMI, M. Y.; SHOJI, S.; YASUO, S. **Highly copper-containing yeast and method for producing the same and highly copper-containing yeast homogenization product, and food**. Patente: JP2004041044, 2004

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, n. 8, p. 834-840, 1990.

GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, p. 25-60, 1993.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 338 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B. Z.; KELLER, P.; LEHR, H.; SIEGEL, S. M. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: kinetic and uptake parameters. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 33, p. 359-371, 1987.

GAUDREAU, H.; CONWAY, J.; CHAMPAGNE, C.P. Production of zinc-enriched extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 348-351, 2001.

GENTLES, J. C.; SCOTT, E. The preservation of medically important fungi. **Sabouraudia**, v. 17, p. 415-418, 1979.

GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HOOG, G. S. de. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 151–162, 1999.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.

GITAN, R. S.; LUO, H.; RODGERS, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28617-28624, 1998.

GODSHALL, M.A.; LEGENDRE, B.L. Phenolic content of maturing sugar cane. **International Sugar Journal**, v. 90, n. 1069, p. 16-19, 1988.

GÖNEN, F.; AKSU, Z. Use of response surface methodology (RSM) in the evaluation of growth and copper(II) bioaccumulation properties of *Candida utilis* in molasses medium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 731-738, 2008.

GOONERATNE, S. R.; BUCKLEY, W. T.; CHRISTENSEN, D. A. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Canadian Journal Animal Science**, v. 69, p. 819-845, 1989.

GONZÁLEZ, F. H.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 198.

GUERINOT, M. L.; EIDE, D. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 244-249, 1999.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Ecology of aquatic yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: biology of yeasts**. v.1. New York: Academic Press, 1987. p. 181-205.

HAHN, J. D.; BAKER, D. H. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 3020-3024, 1993.

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P. A.; CARVALHO, A. D.; ANDRETTA, I.; LEHNEN, C. R. Relação do zinco e cobre plasmáticos com componentes nutricionais e desempenho de leitões: uma meta-análise. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.3, p.427-432, 2008.

HERAS-VAZQUEZ, F. J. L.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; RODRIGUEZ-VICO, F. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 3-9, 2003.

HISANO, H.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.

HOFFMANN, P. Cryopreservation of fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 92-94, 1999.

HUNTER, C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-285, 1998.

HYDE, K. D. **Fungi in marine environments**. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos de composição de alimentos. 3. ed. São Paulo, 1985.

INSTITUTO CUBANO DE PESQUISA DOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR (ICIDCA). **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. p. 49-55, 267-271, 297-301.

JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. **The alcohol textbook**: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 3rd ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 1999. p. 89-96.

KADUKOVÁ J, VIRCÍKOVÁ E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environ Int.** 31(2):227-32, 2005

KAPOOR, A. E.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption: an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1999.

KESSLER, J.; MOREL, I.; DUFEY, P. A.; GUTZWILLER, A.; STERN, A.; GEYER, H. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass meat and claw quality in fattening bulls. **Livestock Production Sciences**, v. 81, p. 161-171, 2003.

KHALED, A. K. D.; NEILAN, B. A.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P. L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 191-197, 1997.

KHAN, S. H. **Production of biomass protein by *Candida utilis* and its biological evaluation in broiler chicks**. M. Sc. (Hons) Thesis– Department of Animal Nutrition, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 1990.

KIRSOP, B. E.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms**: a manual of laboratory methods. London: Academic Press Inc, 1984.

KLOUCEK, P.; SVOBODOVA, B.; POLESNY, Z.; LANGROVA, I.; SMRCEK, S.; KOKOSKA, L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 427-429, 2007.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER E. **Marine mycology**: the higher fungi. New York: Academic Press, 1979. 690 p.

KRAUTER, P.; MARTINELLI, R.; WILLIAMS, K.; MARTINS, S. Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biodegradation**, v. 7, p. 277-286, 1996.

KROGH, N.; OLSEN, J.; JENSEN, B.; REESLEV, M. Uptake of Zn^{2+} by yeast and mycelia growth from of *Aureobasidium pullulans* grown in chemostat culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, p. 249-253, 1998.

KSHEMINSKA, H.; FEDOROVYCH, D.; BABYAK, L., YANOVYCH, D.; KASZYCKI, P.; KOLOCZEK, H. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1565–1572, 2005.

KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. **The yeasts**: a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

KUYUCAK, N. E; VOLESKY, B. Biosorption by algal biomass. In: VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boston, USA: CRC press, 1990. pp. 175-177.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger: 1991. p. 44-71.

LACERDA, L. G. **Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias primas tropicais.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). **The yeasts – a taxonomy study.** 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. pp. 21-30.

LEE, B.-K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 111-124, 2001.

LEIMER, K. H. **Aproveitamento de derivados de levedura em alimentação humana e animal.** Trabalho apresentado no Fórum de Agronegócios: cana-de-açúcar aplicações em biotecnologia, Campinas, 2005.

LEITE, R. A. **Compostos fenólicos do colmo, bainha, folha e palmito da cana-de-açúcar.** 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients.** 3rd ed. Champaign, USA: AOCS Press, 2004. p. 201-208.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras.** v. 1. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MACEDO, J. **Produção de alimentos: o potencial do cerrado.** Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 1996.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, p. 261-278, 2004.

MAMERIN, N.; BOUDRIES, N.; ADDOUR, L.; BELHOCINE, D.; LOUNICI, H.; GRIB, H.; PAUSS, A. Batch zinc biosorption by a bacterial non-living *Streptomyces risomus* biomass. **Water Research**, v. 33, n. 6, p. 1347-1354, 1999.

MAPOLELO, M.; TORTO, N.; PRIOR, B. Evaluation of yeast strains as possible agents for trace enrichment of metal ions in aquatic environments. **Talanta**, v. 65, n. 4, p. 930-937, 2005.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 2845-2855, 2000.

MANZONI, M.; ROLLINI, M. S.; BENEDETTI, A. **Copper-enriched biomass, method for the preparation thereof and pro-biotic, cosmetic, dietary and nutraceutic products comprising the same.** Patente: WO/2010/007586, 2010.

MARÇAL, V. V. M. **Isolamento e caracterização morfogenética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos.** Dissertação (Mestrado Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

MARQUES, A. P.; RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; ORTOLANI, E. L.; GIULIODORI, M. J. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p. 21-32, 2003.

MARTINS, B. de A., COBUCCI, R. de M. A., ROCHA, C., SCHMIDT, F. L. **Avaliação sensorial de amêndoas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) processada no interior do fruto**. VI EDNEDS, Campinas/SP, 2009.

MASON, J. The biochemical pathogenesis of molybdenum induced copper deficiency syndromes in ruminants: towards the final chapter. **British Veterinary Journal**, v. 43, p. 18-21, 1990.

MATIENZO, P. A. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MATTUSCHKA, B.; STRAUBE, G. Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v 58, p. 57-63, 1993.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 524.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 2000.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Implication of yeasts and yeast like fungus in marine processes. **Veroffentlichungen des Instuts fur Meeresforschungin Bremerhaven**, v. 5, p. 321-338, 1974.

MILTIMORE, J. E.; MASON, J. L. Cooper to molybdenun ratio and molybdenun and copper concentration in ruminan feeds. **Canadian Journal Animal Science**, v.51, p. 193-200, 1971.

MIAN, R. **Moagem recorde não sustenta produtividade maior**. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1062614>>. Acesso em: 14/1/2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do agronegócio – Brasil 2008/09 a 2018/19. **Assessoria de Gestão Estratégica**, Brasília, 2009.

MORAES, S. S.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, 1999.

MORO, A. M. ; GROTO, D.; BULÇÃO, R.; POMBLUM, V. J.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M. de; OLIVEIRA, S.; GARCIA, S. C. Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrofotometria Vis comparável à espectrometria de absorção atômica com chama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 251-256, 2007.

MRVČIĆ, J.; STANZER, D.; STEHLIK-TOMAS, V.; ŠKEVIN, D.; GRBA, S. Otimização de bioprocessos para a produção de cobre da biomassa enriquecido industrialmente importante microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p. 331-337, 2007.

MULLEN, M. D.; WOLF, D. C.; FERRIS, F. G.; BEVERIDGE, T. J.; FLEMMING, C. A. E., BAILEY, G. W. Bacterial sorption of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 3143–3149, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington D.C.: National Academy Press, 2001. pp. 381.

O'CONNOR, D. O.; RUBINO, J. R. Phenolic compounds. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4th ed. Philadelphia/London: Lea & Febiger, 1991. p.204-224.

ODDS, F. C. Long- term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, p. 413-415, 1991.

OLIVEIRA, C. G. R. de. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan S.A., 2002. pp.641-651.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. L. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channelfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 133, p. 73-82, 1995.

PETTIT, E.H.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate, cupric citrate, and copper oxychloride to broiler chickens. **Poultry Science**, v.77, p.445-447, 1998.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soils. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.). **The yeasts: biology of the yeasts**. v. 1. 2nd ed. New York: Academic Press, 1987. pp. 123- 180.

PINOTTI, R.F. Quantificação do nível do nitrogênio nas etapas dos processos de produção de álcool. **Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (STAB)**, v. 10, n. 1, p. 34-35, 1991.

PINTO, M. N. **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 1993.

POZO, O. V. C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais**. 100 f. Dissertação (Mestrado??) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de coco.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PRASANNA KUMAR, Y.; KING, P.; PRASAD, V. S. R. K. Zinc biosorption on *Tectona grandis* L.f. leaves biomass: equilibrium and kinetic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, n. 1-3, p. 63-70, 2006.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. DU; RENSBURG, P. VAN. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.

PRICE, M. S.; CLASSEN, J. J. E.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 41-49, 2001.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação.** Londrina: Midiograf, 2001.

RADISKY, D.; KAPLAN, J. Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4481-4484, 1999.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S. H.; JABBAR, M. A.; AWAN, M. S.; HASHMI, A. S. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, v.97, n.15, p.1934-1991, 2006.

RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTT, L. E.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p.534-539, 2006.

REDONDO-BRENES, A.; MONTAGNINI, F. Growth, productivity, aboveground biomass, and carbon sequestration of pure and mixed native tree plantations in the Caribbean lowlands of Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, v. 232, n. 1-3, p. 168-178, 2006.

REED, G. Microbial biomass, single-cell protein, and other microbial products. In: REED, G. **Prescott & Dunn's industrial microbiology**. 4th ed. Westport: AVI, 1982. pp. 541- 592.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservation de fungos e actinomicetos de Interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 159-165, 1992.

RODIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos:** uma estratégia seqüencial de planejamentos. Ed. Casa do Pão: 2005.

ROEPECKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico.** Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O.; ANDRIOLI, J. L.; BARBOSA, J. C. Shiitake *Lentinula edodes* production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 66-71, 2003.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido : avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

SALES, A. M., MENEZES, T. J. de B. Produção de biomassa protéica de mandioca. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 139-146, 1976.

SANADA, C. T. N.; KARP, S. G.; SPIER, M. R.; PORTELLA, A. C.; GOUVÊA, P. M.; YAMAGUISHI, C. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. **Food Research International**, v. 42, p. 476–483, 2009.

SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D. ; SCHMIT, F.; FARIA E. V.; SGARBIERI, V. C. Enriquecimento de macarrão tipo tubo (massa curta) com derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.): impacto nutricional e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 290-295, 2003.

SARTORI, D. **Identificação e análise de variabilidade do fungo *Aspergillus carbonarius* produtor de ocratoxina.** Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

SIQUEIRA, P. F. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*.** Master Dissertation – Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France, 2006.

SIQUEIRA, R. S. de; BORGES, M. de F. Microbiologia de frutas e produtos derivados. In: TORREZAN, R. (Coord.). **Curso de processamento de frutas.** Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, 1997. pp. 2-13.

SKOUNTZOU, P.; SOUPIONI, M.; BEKATOROU, A.; KANELAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Lead(II) uptake using baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1479-1482, 2003.

SKRIVAN, M.; SKRIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. Influence of dietary fat source and copper supplementation on broiler performance, fatty acid profile of meat and depot fat, and on cholesterol content in meat. **British Poultry Science**, v.41, p.608-614, 2000.

SMALING, E. M. A.; ROSCOE, R.; LESSCHEN, J. P.; BOUWMAN, A. F.; COMUNELLO, E. From forest to waste: assessment of the Brazilian soybean chain, using nitrogen as a marker. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 128, p. 185-197, 2008.

SMITH, D. Maintenance of filamentous fungi. In: KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and culture cells.** London: Academic Press, 1991. pp. 134-159.

SMITH, E. L.; HIL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica dos mamíferos**. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduos sólidos de mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. 228 f. Tese – Departamento de Tecnologia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.

SOMEYA, H.; KURYAMA, Y. **Zinc yeast and method for producing the same**. Patente: JP2008099578, 2008.

SOUZA, J. I. de; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SCHOENLEIN, N. C. Bioissorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) Seymour e *Pythium torulosum* Coker & Patterson (Oomycetes). **Acta Botanica Brasílica**, v.22, n.1, p. 217-223, 2008.

SPEARS, J. W. Zinc methionine for ruminant: relative bioavailability of zinc in lambs and effects on growth and performance of growing heifers. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 835-843, 1989.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B. Effect of zinc source (zinc oxide vs. Zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. **Journal of Animal Sciences**, v. 80, p. 2747-2752, 2002.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B.; WARD, J. D. Bioavailability of organic, inorganic trace minerals explored. **Feedstuffs**, v. 27, p. 12-20, 1991.

SPIER, M. R. **Development of a bioprocess for production of a new *A. niger* FS3 phytase: studies of its purification and characterization**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

STEHLIK-THOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 115-120, 2004.

STEHLIK-TOMAS, V.; GRBA, S.; RUNJIC-PERIC, V. Zinc uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and its impact on alcohol fermentation. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 11, p. 147-151, 1997.

STOLL, A.; DUNCAN, J. R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1209-1211, 1996.

SU, K.; HSIE, M.; LEE, H. C. Amino acid composition of various yeasts prepared from cane molasses. In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 13., 1968, Taiwan. **Proceedings**. Amsterdam: Elsevier, 1969. p. 1934-1942.

SUCUPIRA, F. S.; FUENTES, M. F. F.; FREITS, E. R.; BRAZ, N.M. Alimentação de codornas de postura com rações contendo levedura de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.2, p.528-532, mar-abr, 2007.

SUSSUMU, K.; KAZUHIRO, H. **Production of yeast**. Patente: JP2000279164, 2010.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 348-359, 2004.

TING, Y. P.; LOWSON, F.; PRINCE, I. G. Uptake of cadmium and zinc by alga *Chlorella vulgaris*: individual ion species. part 1. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 990-999, 1989.

TOGASHI, M. **Composição e caracterização química e nutricional do fruto baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

TORREZAN, R.; EIROA, M. N. U.; PFENNING, L. Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 2738, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3rd ed. São Paulo, Rio de Janeiro: Atheneu, 1999.

TUCKER, H. F.; SALMON, W. D. Parakeratosis or zinc deficiency disease in pigs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 88, p. 613-616, 1955.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**, 3rd ed. Wallingford: CABI Publ., 1999. pp. 614.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.): caracterização do óleo da semente. **Revista do Instituto Florestal**, v. 2, n. 2, p. 115-125, 1990.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**, 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAN UDEN, N.; FELL, J. W. Marine yeasts. **Advances in Microbiology of the Sea**, v. 1, p. 167-201, 1968.

VASQUEZ, E. F. A.; HERRERA, A. P. N.; SANTIAGO, G. S. Interação cobre molibdênio e enxofre em ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p.1101-1106, 2001.

VEGLIÓ, F.; BEOLCHINI, F.; GASBARRO, A. Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Athrobacter* sp. **Process biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 1997.

VILELA, M. R. Cerrado: a expansão da agricultura. **Informe Agropecuário**, v. 16 n. 173, p. 3, 1992.

VOGEL, A. R.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Análise Química Quantitativa**, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 235-250, 1995.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H.A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 797-806, 1995.

VOSS, M.; THOMAS, R. W. S. P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do Trigo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 947-951, 2001.

YAMAGUISHI, C. T. **Processo biotecnológico para a produção de feijão desidratado com baixo teor de oligossacarídeos da família rafinose**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. A.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, U.S.A.: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILHELMI, B. S.; DUNCAN, J. R. Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1007-1012, 1995.

WOOLLETT, L. L.; HENDRICK, L. R.. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology**, v. 36, p. 427- 435, 1970.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4486-4496, 2003.

YAZGAN, A.; OZCENGIZ, G. Subcellular distribution of accumulated heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 871-874, 1994.

YU, X.; LI, Z.; YU, M.; YAO, J. ZHANG, Y.; ZHANG, H. **Multi-nutrilit composite yeast powder**. Patente: CN101361567, 2010.